

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
MUSEU NACIONAL
PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

Distinção de Espécies de *Amphimedon* Duchassaing & Michelotti, 1864 (Niphatidae, Haplosclerida, Demospongiae) da costa brasileira por estudos de diversidade genética e morfológica



Thomáz Vieiraves

Rio de Janeiro

2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
MUSEU NACIONAL
PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

**Distinção de Espécies de *Amphimedon* Duchassaing &
Michelotti, 1864 (Niphatidae, Haplosclerida, Demospongiae) da
costa brasileira por estudos de diversidade genética e morfológica**

Thomáz Vieirals

Dissertação apresentada à Pós-Graduação em
Zoologia do Museu Nacional, Universidade
Federal do Rio de Janeiro como parte dos
requisitos necessários à obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biológicas – Zoologia.

Rio de Janeiro
2004

FICHA CATALOGRÁFICA

Thomáz Vieiralves

Distinção de Espécies de *Amphimedon* Duchassaing & Michelotti, 1864 (Niphatidae, Haplosclerida, Demospongiae) da costa brasileira por estudos de diversidade genética e morfológica / Thomáz Vieiralves - 2004.

xix, 88p.: il.

Orientador: Eduardo C. M. Hajdu;
Co-orientadora: Gisele Lobo Hajdu.

Dissertação (Mestrado) – Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro,
- Pós-graduação em Zoologia.

1. Variabilidade genética. 2. *Amphimedon*. 3. Porifera. 4. Teses. I. Hajdu, Eduardo C. M. II. Lobo-Hajdu, Gisele. III. Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro. IV. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
MUSEU NACIONAL
PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

**Distinção de Espécies de *Amphimedon* Duchassaing &
Michelotti, 1864 (Niphatidae, Haplosclerida, Demospongiae) da
costa brasileira por estudos de diversidade genética e morfológica**

Thomáz Vieiralves

Orientador: Eduardo C. M. Hajdu

Co-orientadora: Gisele Lôbo Hajdu

Aprovada em ____ de março de 2004 pela banca examinadora:

Prof. Dr. Eduardo C. M. Hajdu (MN-UFRJ, presidente) _____

Prof. Dr. Guilherme R. da S. Muricy (MN-UFRJ, titular) _____

Profa. Dra. Michelle Klautau (UFRJ, titular) _____

Profa Dra Carla Menegola da Silva (UERJ-FFP, suplente) _____

Rio de Janeiro

2004

As mulheres de minha vida:

Minha mãe, Vera;

E minhas irmãs Pryscila e Melissa;

E aos meus dois melhores amigos:

Meu sobrinho Pietrus,

*E meu pai Antônio (que tanto em vida
como agora em meus pensamentos sempre
me apoia e me conforta).*

**“As dificuldades são como as montanhas.
Elas só se aplainam quando avançamos
sobre elas.”**

(provérbio japonês)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à todos aqueles que me ajudaram nesses dois anos da minha vida.

Agradeço todo dia pela família que tenho, pela minha mãe que mesmo sabendo que estes dois anos seriam difíceis, me deu apoio, amor e afeto. Incentivou-me, mesmo quando eu pensei em desistir. Às minhas duas irmãs que sempre foram boas conselheiras, amigas e comparsas. Ao meu sobrinho, que nasceu pouco tempo antes do início do mestrado e manteve minha vida cheia de surpresas e alegrias. E ao meu pai que mesmo sendo severo, sempre me apoiou e sempre esteve presente nos momentos difíceis.

À Petrobrás, por ter acreditado no meu projeto e ter me proporcionado à bolsa de Mestrado, que tanto me foi útil, pois sem esta talvez fosse impossível a realização desta dissertação.

Por aqueles que acreditaram em mim de qualquer maneira, obrigado às minhas três melhores amigas, Silvia, Vanessa e Elaine, por terem me ajudado em mais uma etapa de minha vida, por terem vibrado com cada vitória minha e por terem me oferecido o ombro sempre que precisei.

Aos amigos de departamento e laboratório, que me ajudaram profissionalmente: Dona Iaci, Marciane (vulga Barbie), Dona Ugui, Valéria, Ana Paula, Marco Aurélio e todos os outros. Obrigado pelos bolos, pelas conversas nos intervalos dos experimentos, pelo empréstimo de material e pelo cafezinho, que sempre foi bem vindo.

Aos amigos Fernando (Mestre dos Magos), Raquel, Dona Soc, Dona Beth, Cláudia, Mimi Merenda, Dona Angela San e Richard, vocês realmente merecem um prêmio muito maior que este agradecimento...

A Carol (menina Poltergeist), Adriana (bicho da goiaba) e Flávia (Sandy), as grandes super poderosas, que mesmo separadas me deram apoio e conselhos. Cada uma de vocês teve um papel importante durante todo esse período de experimentos e escrita. À Carol, que mesmo com todos os problemas, nunca perdeu a sua alegria e dom de passar seu conhecer, mesmo sem querer. À Adriana, que mesmo depois de nossos desentendimentos do passado, conseguiu relevar tudo e hoje em dia eu posso te considerar uma boa amiga. E a Flávia, mesmo com esse seu jeito meio doido de ser, sempre conseguiu me alegrar e me auxiliar nos momentos difíceis. A vocês três eu agradeço por tudo que me ensinaram.

À Dona Débora, a nossa química, que nas horas vagas serve de guru e astróloga, espero ter você como minha amiga e conselheira por muito tempo.

À Dona Anete, que com seus doces e palavras meigas, sempre esteve disposta a me ajudar nos assuntos burocráticos do mestrado.

Aos amigos Cristininha, Mari baguncinha, Dani Jolie, Mayra, Fernandinho, Mastodonte, Maclau, Suzi, Pernambuco, Pablo e Bolão, agradeço a vocês pelos bons papos na hora do almoço, aos conselhos de como fazer um bom corte de esqueleto e uma boa lâmina de espícula.

Aos meus bons amigos da Celenterologia Marcelinho, Moniquinha, Alice e Livia, que sempre se mostraram prestativos e bons conselheiros e aos amigos André, Mariana e professora Andréia Junqueira, que muito me ensinaram sobre biomonitoramento de poluição, bem como que sem as dicas dadas pelo André, eu poderia até ter perdido a bolsa de Mestrado.

Ao Moacir que veio do Museu Nacional, com seu jeito zen de ser, logo se tornou um grande colega e posteriormente ao comprar meu ideal, se tornou meu supervisor. Obrigado pelo apoio, obrigado por você acreditar em mim.

Ao Irapuã que me deu todo suporte para a obtenção da bolsa Petrobrás, tendo toda paciência do mundo, respondeu todas as minhas dúvidas e sempre garantiu que eu recebesse em dia a minha bolsa.

Ao Joel de Paula que lutou bravamente com o PhotoShop para clarear os fundos dos géis de SSCP.

À Doutora Prenda-do-homem-da-foto, Dona Carlota, nos conhecemos no seu doutorado, quando eu te ajudei no laboratório. E você, hoje em dia acabou se tornando uma grande amiga e professora. Todo dia eu agradeço por tudo o que você fez por mim, quando resolveu me ajudar na análise morfológica das minhas esponjas.

Aos professores Alexande de Gusmão Pedrini e Leila Maria Lopez Bezerra, que gentilmente me permitiram usar seus microscópios para fazer mensurações de espículas e fotografias dos cortes de esqueleto. À professora Elvira Carvajal, que sempre foi uma boa companhia nos fins das festas.

Professor Guilherme Muricy quero te agradecer do fundo do meu coração pelas broncas, pois elas vieram em boa hora, pois me ajudaram a me direcionar para o caminho correto, pelas conversas no laboratório e pelos conselhos dados, agradeço por tudo que me fez.

Ao meu orientador Eduardo Hajdu, que aceitou me orientar, mesmo não me conhecendo, que apostou em mim, mesmo sabendo que eu não tinha conhecimento algum de taxonomia e sistemática de Porifera. Obrigado por ter aceitado esse desafio de me orientar.

À Gisele Lôbo-Hajdu, que me aceitou como apoio técnico e como mestrando, que sem o seu carinho, dedicação, apoio, conselhos e **muita** paciência seria impossível a realização deste trabalho.

E não poderia esquecer Ingrid e a Meiryelen, agradeço por todo o apoio e esforço oferecido para que eu pudesse obter todos os resultados de morfologia desta dissertação. Sempre serei grato a vocês duas pelo seu apoio. Ao Zé Eduardo, mesmo não concordando com tudo o que você crê, você me deu um grande apoio na contagem das espículas. E não poderia esquecer o único estagiário que não fugiu do meu jeito carrasco de ser. Agradeço a você, Leonardo, por todo o apoio que você me ofereceu durante esse período de dissertação, por me ouvir reclamar dos experimentos que não deram certo, por me auxiliar aplicando gel, por me ajudar no PCR. Saiba que você mostrou ser um grande amigo e camarada.

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Amostras usadas para o estudo	13-15
Tabela 2: Mensurações micrométricas de <i>Amphimedon viridis</i>	36
Tabela 3: Mensurações micrométricas das espículas, distribuição geográfica e batimétrica de <i>A. viridis</i>	37
Tabela 4. Mensurações micrométricas de <i>Amphimedon</i> aff. <i>compressa</i>	43
Tabela 5. Mensurações micrométricas das espículas, distribuição geográfica e batimétrica de <i>A. compressa</i>	44

LISTA DE PRANCHAS

	Página
Prancha 1: Indivíduos de <i>Amphimedon viridis</i> “in situ”	33
Prancha 2: Arquitetura esquelética, cortes e espículas de indivíduos de <i>Amphimedon viridis</i>	35
Prancha 3: <i>Amphimedon viridis</i> fixadas, coleção do Museu Nacional	38
Prancha 4: Indivíduos de <i>Amphimedon compressa</i> “in situ”	40
Prancha 5: Diferentes morfotipos de <i>Amphimedon</i> aff. <i>compressa</i> “in situ”	41
Prancha 6: Arquitetura esquelética, cortes e espículas de indivíduos de <i>Amphimedon compressa</i>	42
Prancha 7: <i>Amphimedon compressa</i> e <i>Amphimedon</i> aff. <i>compressa</i> fixadas, coleção do Museu Nacional	45

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Página

Figura 1: Esquema da organização celular e dos tipos celulares	2
Figura 2: Mapa apresentando distribuição dos pontos de coleta das amostras analisadas	12
Figura 3: Esquema apresentando os diferentes tipos de fixadores usados	20
Figura 4: Esquema do processo de extração de DNA genômico total	22
Figura 5: Esquema da quantificação do DNA em gel de agarose	23
Figura 6: Esquema da organização gênica da unidade transcricional do RNAr	25
Figura 7: Esquema apresentando a escolha dos oligonucleotídeos, onde: 1 e 2 equivalem aos oligonucleotídeos de ITS1 e 3 e 4 ao ITS2.	25
Figura 8: Etapas da reação de PCR.	26
Figura 9: Esquema da visualização dos produtos da PCR em gel de agarose	27
Figura 10: Esquema da técnica do polimorfismo de <u>conformação</u> de fita simples (SSCP).	28
Figura 11: Gel de agarose a 0,8% para quantificação do DNA genômico extraído	46
Figura 12: Gel de agarose a 0,8% apresentando o DNA genômico total extraído de amostras preservadas em diferentes fixadores por 30 e 60 dias	48
Figura 13: Gel de agarose a 0,8% para quantificação do DNA genômico extraído de amostras preservadas em diferentes fixadores por 7 dias	48

Figura 14: Gel de agarose 2% apresentando os padrões dos fragmentos de ITS2	50
Figura 15: Gel de agarose 2% apresentando os padrões dos fragmentos de ITS1 e ITS2	51
Figura 16: Gel #1 de SSCP-PAGE apresentando pouca variação da região de ITS1 em <i>Amphimedon viridis</i>	53
Figura 17: Gel #2 de SSCP-PAGE apresentando pouca variação da região de ITS1 em <i>Amphimedon viridis</i>	54
Figura 18: Gel #3 de SSCP-PAGE apresentando pouca variação da região de ITS1 em <i>Amphimedon viridis</i>	55
Figura 19: Gel #4 de SSCP-PAGE apresentando pouca variação da região de ITS1 em <i>Amphimedon viridis</i>	56
Figura 20: Gel de SSCP-PAGE na concentração de 8%, apresentando variação da região de ITS1 em <i>Amphimedon aff. compressa</i>	58
Figura 21: Gel de SSCP-PAGE na concentração de 8%, apresentando pouca variação da região de ITS2 em <i>Amphimedon aff. compressa</i>	59
Figura 22: Gel de SSCP-PAGE na concentração de 8%, apresentando pouca variação da região de ITS1 em <i>Amphimedon viridis</i> e <i>A. aff. compressa</i>	60

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A - adenina

A. - *Amphimedon*

A. aff. - *Amphimedon* afinidade

APS - persulfato de amônio

C – citosina

DBCG – Departamento de Biologia Celular e Genética

DMSO - dimetil sulfóxido

DNA - ácido desoxirribonucleico

dNTP- desoxirribonucleotídeos trifosfato

EDTA - ácido etilenediaminetetracético

et al. - e colaboradores

ETS - external transcribed spacer, espaçador externo transcrito

G – guanina

H₂O – água

IBRAG – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

ITS - internal transcribed spacer, espaçador interno transcrito

MNRJ - Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro

NTS - (external) non-transcribed spacer, espaçador (externo) não transcrito

pb - pares de bases

PCR - polymerase chain reaction, reação em cadeia da polimerase

Pfu- Pirococcus furiosus

RNAr- Ácido ribonucléico ribossomal

RNA- Ácido ribonucléico

rpm- Rotações por minuto

sp.n.- espécie nova

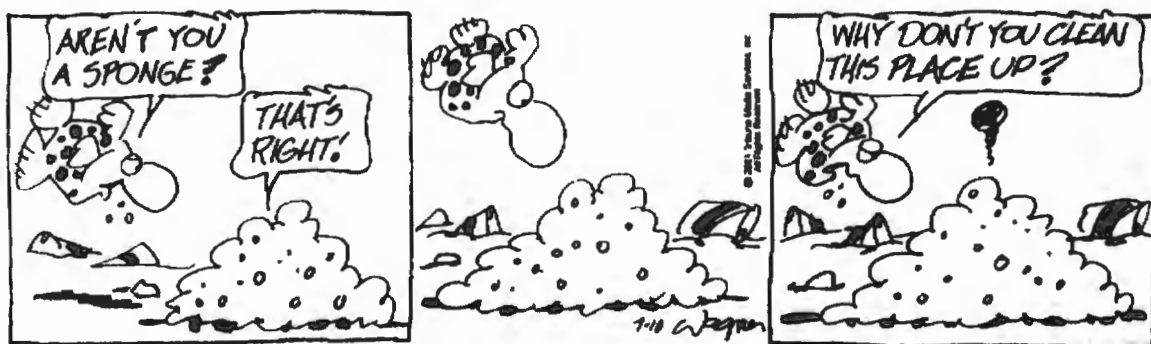
SSCP- single-stand conformation polymorphism, polimorfismo de conformação de fita simples

SDS - duodecil sulfato de sódio

TEMED - N’N’N’N’ tetrametiletilenodiamina

Tris - hidroximetil aminometano cristalizado

U – unidades



SUMÁRIO

	Páginas
Folhas de Rosto	i-ii
Ficha Catalográfica	iii
Avaliadores	iv
Dedicatória	v
Resenha	vi
Agradecimentos	vii-x
Lista de tabelas	xi
Lista de pranchas	xii
Lista de ilustrações	xiii-xiv
Lista de siglas e abreviaturas	xv-xvi
Sumário	xvii
Resumo	xviii
Abstract	xlx
Introdução	1-09
Objetivos	10
Materiais e métodos	11-30
Resultados e discussão	31-63
Conclusões	64
Referências Bibliográficas	65-88

RESUMO

A taxonomia de *Amphimedon* é complicada devido à sua ampla distribuição e abundância de morfotipos. O objetivo deste trabalho foi caracterizar as espécies de *Amphimedon* da costa brasileira pelo estudo combinado de técnicas morfológicas e de polimorfismos do DNA. Foram utilizadas amostras provenientes da coleção do Museu Nacional (MN-UFRJ) de *Amphimedon viridis*, *A. compressa* e *A. aff. compressa*. O DNA genômico foi extraído e as regiões dos espaçadores internos transcritos (ITS-1 e ITS-2) dos genes que codificam para o RNA ribossomal (RNAr) nuclear foram amplificadas. Após a amplificação, as amostras foram submetidas à técnica do polimorfismo de Conformação de Fita Simples (SSCP). Os resultados apresentados apóiam a idéia de que *A. aff. compressa* inclui espécies distintas quando utilizamos a regiões de ITS1 como caracter molecular. Do mesmo modo, estes resultados indicam a possibilidade das *Amphimedon viridis* da região Nordeste e Sudeste serem co-específicas, ocorrendo homogeneamente ao longo da costa brasileira. Nossos resultados permitiram a diferenciação das espécies de *Amphimedon* pela técnica conjugada de PCR-SSCP, demonstrando a viabilidade deste método na distinção de espécies de esponjas marinhas.

ABSTRACT

The taxonomy of *Amphimedon* is complicated due to its wide distribution and abundance of morphotypes. The objective of this work was to characterize the species of *Amphimedon* from the Brazilian Coast by the combined study of morphology and DNA polymorphisms. The samples utilized were derived from the collections of Museu Nacional (MNRJ), and comprised *Amphimedon viridis*, *A. compressa* e *A. aff. compressa*. The genomic DNA was extracted and the regions of the internal transcribed spacers (ITS-1 and ITS-2) coding for nuclear ribosomal RNA were amplified. After amplifications, samples were subjected to the Single Strand Conformation Polimorphism (SSCP) technique. The individuals of *Amphimedon viridis* show a similar ITS1 migration pattern, even when coming from distant collecting localities on the Brazilian Coast. The results presented support the idea that *A. aff. compressa* comprises distinct species when we utilize ITS1 regions as a molecular character. In the same way, these results indicate the possibility that *A. viridis* from the northeastern and southeastern Brazilian regions are conspecific, occurring homogeneously along the Brazilian coast. Our results enabled the differentiation of *Amphimedon* species through the combined PCR-SSCP technique, showing the potential use of this method for the distinction of species of marine sponges.

Introdução

As esponjas (Filo Porifera) estão dentre os animais pluricelulares vivos mais antigos na Terra. Elas são consideradas um dos filos mais bem sucedidos e de maior diversidade, não pelo seu número de espécies, mas pela variabilidade dos caracteres morfológicos e fisiológicos exibidos pelas espécies (HOOPER & VAN SOEST, 2002). Apesar da maioria dos antigos grupos de esponjas ter se extinguido no final do Devoniano, as sobreviventes ocupam atualmente todos os Oceanos, podendo ser encontradas desde as zonas litorâneas (inclusive no entre-marés) até as abissais. Isto se deve à sua alta capacidade de adaptação às mais diversas variáveis climáticas (VACELET, 1999), traduzindo-se em sua alta representatividade em comunidades bentônicas, especialmente de substrato consolidado, tais como os costões rochosos, recifes coralinos e fundos de rodolitos brasileiros (HAJDU *et al.*, 1996 e 1999).

Atualmente são estimadas cerca de 15 mil espécies de esponjas nos ambientes marinhos e de água doce, mas esse número é sem dúvida uma pequena fração daquelas que já povoaram os mares e ambientes dulciaquícolas do planeta (HOOPER & VAN SOEST, 2002). Na costa brasileira são registradas cerca de 350 espécies (HAJDU *et al.*, 1996 e 1999), mas centenas de espécies novas repousam nas grandes coleções brasileiras, aguardando o momento em que o esforço taxonômico dispendido no filo lhes permitirá figurar nas estatísticas acerca da biodiversidade marinha brasileira (E. HAJDU, com. pess.).

As esponjas são em sua maioria organismos sésseis e filtradores, com uma fisiologia bem simples. São formadas por células flageladas (coanócitos) que têm como função promover a circulação de água através de um sistema de canais, denominado sistema aquífero, por diversos outros tipos celulares de funções mais ou menos especializadas, e por células com um alto grau de totipotência. Seu esqueleto pode ser composto de pequenas estruturas formadas por sílica ou calcário chamadas de espículas, variando de micrômetros a centímetros (Figura 1). Algumas esponjas, alternativamente, possuem um esqueleto formado por fibras de espongina (material afim ao colágeno), que pode também estar associado às espículas silicosas, ou ser ainda composto de uma base calcárea maciça, como é o caso das esponjas coralinas (BERGQUIST, 1980). Recentemente, descobriram-se algumas espécies que fogem ao convencional, sendo carnívoras e não possuindo sistema aquífero (família Cladorhizidae; VACELET, 1995). Essa adaptabilidade associada a uma relativa simplicidade tem assegurado o sucesso evolutivo do grupo. BERGQUIST (1978), DE VOS *et al.* (1990), RÜTZLER (1990), e VAN SOEST *et al.* (1994) fornecem uma visão geral da biologia dos poríferos.

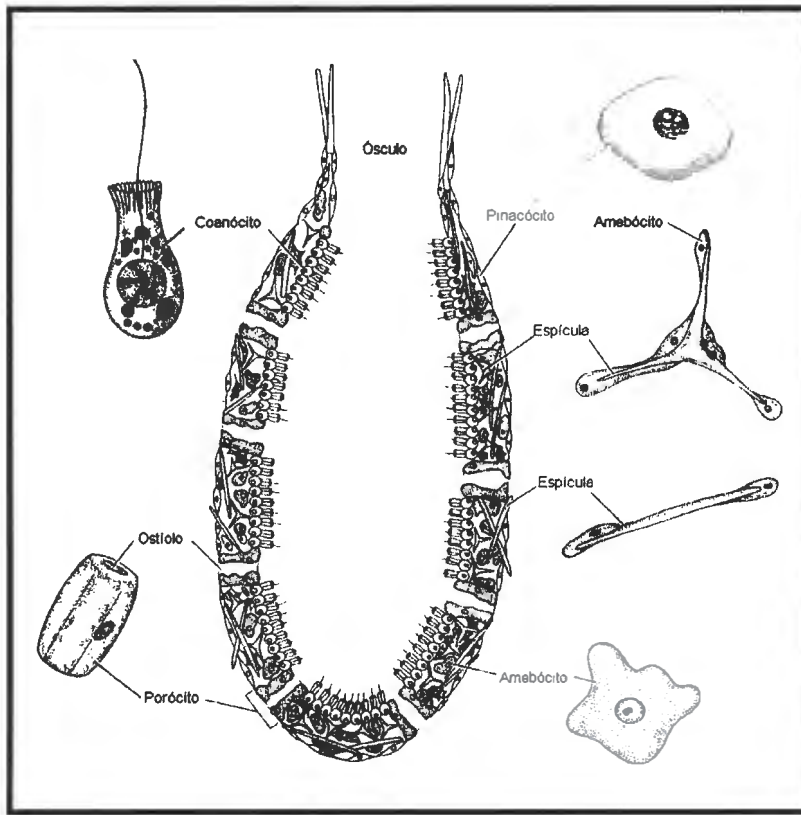


Figura 1: Esquema da organização celular e dos tipos celulares (BRUSCA & BRUSCA, 1990).

Tendo em vista que a maior parte das esponjas é sésil e filtradora, e, portanto, facilmente acessível aos predadores, tiveram de buscar métodos alternativos ao costumeiro “correr e/ou morder” para defender-se de predadores, assim como para conquistar e garantir seu substrato. A análise de extratos de esponjas permitiu verificar a existência de uma rica química, mais diversificada que a de qualquer outro grupo da fauna ou da flora, incluindo considerável número de compostos bioativos de grande interesse bioquímico e farmacológico (FAULKNER, 1978; GARSON, 1994), freqüentemente associados à competição química e prevenção da predação (MURICY *et al.*, 1993; ENGEL & PAWLIK, 2000). Dentre diversas atividades biológicas, há compostos com atividade citotóxica, antifúngica,

antimicrobiana e antiviral, já demonstradamente entre espécies brasileiras também (FAULKNER, 1978; GARSON, 1994; BERLINCK *et al.*, 1996; DUMDEI *et al.*, 1996; ALMEIDA *et al.*, 1997; KELMAN *et al.*, 2001; RANGEL *et al.*, 2001; PROKSCH, 2002; MAYER, 2003).

Esponjas podem também acumular diversas moléculas exógenas, tais como metais pesados e hidrocarbonetos, o que as torna um instrumento para o biomonitoramento de poluição (ALCOLADO, 1984; ALCOLADO & HERRERA, 1987; MURICY, 1989, 1991; RICHELLE-MAURER *et al.*, 1994; PEREZ, 2000; PEREZ *et al.*, 2003).

A importância de se incentivar estudos na área de sistemática/taxonomia de Porifera é urgente (HOOPER & LÉVI, 1994; KELLY-BORGES & VALENTINE, 1995), especialmente no caso do Brasil (HAJDU *et al.*, 1996, 1999), que deve ser tratado com a devida prioridade, para alicerçar a crescente demanda de identificações confiáveis partindo de grupos brasileiros dedicados à pesquisa químico-farmacológica (e.g. grupos de pesquisa em Porto Alegre, São Carlos, Rio de Janeiro, Fortaleza; E. HAJDU, com. pess.).

Um dos principais problemas para estudos sobre a biologia de esponjas se deve ao fato de que a classificação destes animais ainda não é suficientemente sólida, sendo também muito complexa para não especialistas. Os poríferos apresentam uma enorme variabilidade morfológica acompanhada por grande variabilidade genética, como indicam estudos recentes com isoenzimas e tipagem de DNA (SOLÉ-CAVA & THORPE, 1991 e 1994; LÔBO-HAJDU *et al.*, 1999). Estes

problemas são também comuns a uma grande variedade de organismos marinhos onde ocorrem complexos de espécies crípticas, organismos estreitamente relacionados e semelhantes morfológicamente onde a separação de espécies é difícil se dependente única e exclusivamente de técnicas taxonômicas convencionais tais como a observação de espículas e esqueletos (KNOWLTON, 1993).

A classificação baseada somente em caracteres morfológicos tem sido a causa da dificuldade no reconhecimento de muitas espécies integrantes de complexos de espécies crípticas, sobretudo onde os caracteres morfológicos são escassos (EL TAI *et al.*, 2000; ZHU *et al.*, 2000; ASENSIO *et al.*, 2001).

Amphimedon Duchassaing & Michelotti, 1864 (Haplosclerida), da família Niphatidae (Chalinina), apresenta distribuição cosmotropical (FROMONT, 1993; VAN SOEST, 1994; DESQUEYROUX-FAÚNDEZ & VALENTINE, 2002; HELMY & VAN SOEST, *no prelo*), porém, ao contrário da regra, é mais rico no Oceano Atlântico do que nos demais Oceanos. Apenas três registros estão publicados para a costa brasileira, entretanto, *A. viridis*, *A. erina* e *A. sp.*, sendo *A. erina* duvidoso (MURICY & RIBEIRO, 1999). Coletas recentes efetuadas em diversos pontos do litoral brasileiro revelaram a presença de algumas espécies de difícil alocação, o que motivou o início de uma revisão taxonômica do gênero (E. HAJDU *et colls.*, *em prep.*).

Histórico da Classificação de *Amphimedon*

O histórico da classificação do gênero *Amphimedon* apresentado a seguir é adaptado de DESQUEYROUX-FAÚNDEZ & VALENTINE (2002).

DE LAUBENFELS (1936a) incluiu *Amphimedon* em sua nova família, Haliclonidae De Laubenfels, 1936, atualmente considerada sinônima de Chalinidae (DESQUEYROUX-FAÚNDEZ & VALENTINE, 2002), erigida para esponjas com espículas predominantemente diactinais distribuídas mais ou menos homogeneamente no esqueleto, sem qualquer especialização ectossomal, ressaltando que *Amphimedon* difere de *Haliclona* principalmente por possuir fibras longitudinais projetadas além da superfície da esponja.

BURTON (1937) criou *Hemihaliclona*, designando *Amphimedon viridis* como espécie-tipo. Esta decisão não foi acatada por WIEDENMAYER (1977: 82) que considerou *Hemihaliclona* sinônimo junior subjetivo de *Amphimedon*, tratado como um subgênero de *Haliclona*.

VAN SOEST (1980) considerou a presença de uma reticulação ectossomal tangencial como justificativa para o restabelecimento do status genérico de *Amphimedon* e transferência deste para a nova família Niphatidae. Este mesmo autor considerou ainda *Pachychalina* Schmidt, 1868 como um sinônimo junior de *Amphimedon*, em parte devido à sua espécie-tipo insuficientemente conhecida, tendo sido seguido nesta decisão por FROMONT (1993). Recentemente, DESQUEYROUX-FAÚNDEZ & VALENTINE (2002) re-descreveram a

espécie-tipo de *Pachychalina*, viz. *P. rustica* Schmidt, 1868, reconhecendo suficientes diferenças para manter o gênero como válido. VAN SOEST (1980) ressaltou ainda que *A. viridis* Duchassaing & Michelotti, 1864 não era uma *Amphimedon* típica, mas nem ele, nem DESQUEYROUX-FAÚNDEZ & VALENTINE (2002) julgaram apropriado recuperar *Hemihaliclona*.

Racional desta Dissertação

A biologia molecular é mais uma ferramenta para elucidação da classificação, contribuindo para uma alocação mais precisa dos organismos na hierarquia evolutiva, base das classificações modernas (PALUMBI, 1996). Marcadores genéticos possibilitam a inferência de processos populacionais e filogenéticos. A escolha do gene que será estudado é de fundamental importância para a resolução de determinado problema. Esta escolha é feita de acordo com o organismo alvo, a abordagem do estudo e os dados oferecidos pela literatura, mostrando as vantagens e desvantagens da informação potencialmente contida naquela sequência (HILLIS *et al.*, 1996; MORITZ & HILLIS, 1996).

A análise dos genes do RNA ribossomal (RNAr) têm sido muito utilizada para estimar a filogenia de espécies de diversos organismos (HILLIS & DIXON, 1991), tendo sido o foco de diversas abordagens em sistemática molecular. Estes genes são de evolução mista, englobando regiões altamente conservadas (18S, 5.8S e 28S) e outras altamente polimórficas (espaçadores externos não transcritos - NTS,

espaçadores internos – ITS e externos transcritos - ETS). Outra vantagem do RNAr decorre da presença de cópias múltiplas por genoma (devido à sua alta funcionalidade) o que facilita a obtenção de material em boas condições mesmo de amostras com alta probabilidade de degradação, tais como aquelas preservadas por muito tempo em coleções de museus (HILLIS & DIXON, 1991; DESSAUER *et al.*, 1996; HILLIS *et al.*, 1996).

Nesta dissertação, partiu-se da premissa de que os ITS das esponjas acumulariam mutações suficientes para solucionar problemas de classificação no nível de espécie (e.g. *Aplysina*, LAMARÃO, 2002; *Hymeniacidon*, GUIMARÃES, 2002; *Geodia*, SILVA, 2002; e *Mycale*, SALGADO, 2003). Esta molécula vem sendo apontada como eficaz para a distinção da variabilidade genética em outros organismos (ZHU *et al.*, 2000; SUNNUCKS *et al.*, 2000).

O nível de variação genética em populações naturais de esponjas é ainda muito pouco conhecido, e sem estas informações é difícil estimar a verdadeira biodiversidade das esponjas.

Informações mais precisas sobre a diversidade molecular presente no extenso litoral brasileiro permitirão estabelecer uma série de estratégias de exploração econômica sustentável a médio e longo prazo, podendo gerar dividendos e colocar o país numa posição de destaque no cenário mundial, como uma das poucas nações tropicais capazes de gerenciar efetivamente seus recursos biológicos marinhos. A integração entre os métodos de sistemática convencional e molecular, com análise genética e bioquímica, nos possibilitará uma compreensão mais exata da

diversidade do mar brasileiro, permitindo-nos proteger, explorar e gerenciar estes enormes recursos (LANA *et al.*, 1996; HAJDU *et al.*, 1996).

Estudos visando avaliação do potencial bioativo de diversas esponjas da costa brasileira apontam o gênero *Amphimedon* como portador de importantes propriedades antibacterianas, citotóxicas e inibidoras da contração muscular. A espécie *Amphimedon viridis* possui moléculas bioativas que reúnem propriedades antibacterianas, ictiotóxicas, hipoglicêmicas e antitumorais (MURICY & SILVA, 1999), além de ação hemolítica, descoberta recentemente (BERLINCK *et al.*, 1996; ALMEIDA *et al.*, 1997; CHEHADE *et al.*, 1997; RANGEL *et al.*, 2001), abrindo espaço para a potencial aplicação bioquímico/farmacológica de substâncias extraídas destas esponjas.

O estudo taxonômico empreendido aqui buscou verificar a confiabilidade de identificações prévias de *Amphimedon viridis* e *A. aff compressa* coletadas ao longo da costa brasileira. A dificuldade em obter-se uma identificação precisa das espécies desse gênero deve-se à ocorrência de uma única categoria de espícula de forma simples (óxea) constituindo as fibras esqueléticas, além de significativas variações de cor e forma das esponjas nas populações observadas ao longo da costa brasileira e caribenha. A análise em questão é decisiva para definir a variabilidade genética intra- e interespecífica, a qual irá, por sua vez, garantir precisão também em novos estudos acerca das propriedades bioativas das espécies de *Amphimedon*. O padrão de comparação foi estabelecido com espécimes de ambas as espécies, coletados em localidades no Caribe, mais próximas às suas localidades tipo.

Objetivos

A presente dissertação objetiva contribuir para o estudo taxonômico do gênero *Amphimedon* Duchassaing & Michelotti, 1864 na costa brasileira

São objetivos específicos deste trabalho responder às seguintes questões:

- (1) as *Amphimedon viridis* do Nordeste e as *Amphimedon viridis* do Sudeste são co-específicas ou não?
- (2) as *Amphimedon viridis* do Sudeste e do Nordeste e as *Amphimedon* aff. *compressa* do Nordeste e Sudeste brasileiros são co-específicas ou não?
- (3) as *Amphimedon compressa* do Caribe e as *Amphimedon* aff. *compressa* do Nordeste e Sudeste brasileiros são co-específicas ou não?

Material e Métodos

Seleção do material

O material brasileiro estudado aqui é proveniente de coletas realizadas nos estados de Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo, por meio de mergulho livre e autônomo. As séries de espécimes coletados foram complementadas com material oriundo da Coleção de Poríferos do Museu Nacional/UFRJ. Adicionalmente, material proveniente do Caribe foi usado para comparação, parte do qual coletado em Cuba, a outra parte sub amostrada na Coleção do Museu Nacional, é proveniente de Belize. Para a seleção do material proveniente da coleção foram selecionados somente os exemplares que sabidamente não passaram durante o seu processo de fixação por soluções contendo formaldeído, poderoso agente degradador do DNA.

A tabela 1 apresenta os dados de coleta de cada um dos espécimes estudados, e a figura 2, a distribuição das localidades de coleta ao longo do Atlântico Tropical Ocidental.

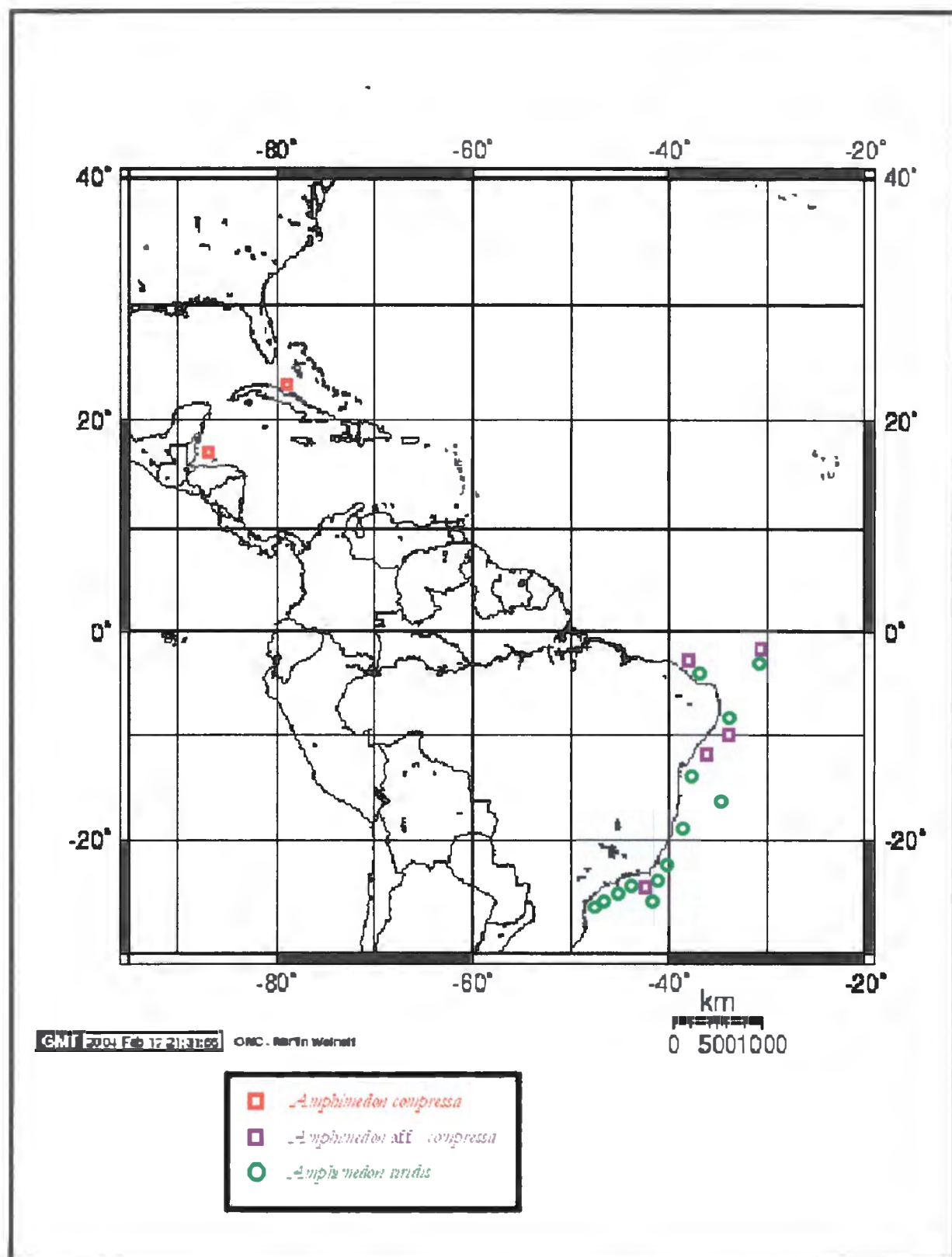


Figura 2: Mapa apresentando distribuição dos pontos de coleta das amostras analisadas.

Todos os espécimes usados nesse estudo foram tombados na Coleção de Poríferos do Museu Nacional do Rio de Janeiro/UFRJ, apenas algumas amostras de Cuba estão tombadas com numeração do grupo Organização Genômica de Porifera da UERJ, como é apresentado na tabela abaixo:

Tabela 1: Amostras usadas para o estudo

IDENTIFICAÇÃO	LOCALIDADE	NÚMERO DE AMOSTRAS	COLETOR	DATA DE COLETA	PROFUNDIDADE
<i>Amphimedon compressa</i>	Cueva de los Peces, Cuba	UERJ 201	G. Muricy	04/XII/2003	15 metros
		UERJ 204	G. Muricy	04/XII/2003	15 metros
		UERJ 211	G. Muricy	04/XII/2003	15 metros
	Playa de los Perdizes, Cuba	UERJ 202	G. Muricy	04/XII/2003	15 metros
		UERJ 205	G. Muricy	04/XII/2003	15 metros
		UER J206	G. Muricy	04/XII/2003	15 metros
	Carrie Bow Cay, Belize	MNRJ 1119	E. Hajdu & K. Smith	15/VIII/1993	15 metros
		UFRJPOR 4133	E. Hajdu & K. Smith	15/VIII/1993	15 metros
<i>Amphimedon</i> <i>aff. compressa</i>	Canoa Quebrada, CE	MNRJ 3043	M. Guimarães e Alexandre	___/II/2000	25 metros
	Atol das Rocas, RN	MNRJ 2140	G. Muricy	08/III/1999	11 metros
		MNRJ 2155	G. Muricy	04/III/1999	-
		MNRJ 2160	G. Muricy	25/II/1999	0,5 metros
		MNRJ 2167	G. Muricy	25/II/1999	0,5 metros
		MNRJ 4497	G. Neves	___/XI/1999	
		MNRJ 6260	E. Hajdu, M. Ventura & U. Pinheiro	22/VIII/2002	
		MNRJ 6261	E. Hajdu, M. Ventura & U. Pinheiro	22/VIII/2002	
		MNRJ 6262	E. Hajdu, M. Ventura & U. Pinheiro	22/VIII/2002	
		MNRJ 6263	E. Hajdu, M. Ventura & U. Pinheiro	22/VIII/2002	

<i>Amphimedon</i> <i>aff. compressa</i>	Atol das Rocas, RN	MNRJ 6264	E. Hajdu, M. Ventura & U. Pinheiro	22/VIII/2002	
	Marechal Deodoro (Praia do Francês), AL	MNRJ 4707	E. Hajdu	04/IX/2001	1 – 3 metros
		MNRJ 4709	E. Hajdu	04/IX/2001	1 – 3 metros
	Angra dos Reis, RJ	MNRJ 7244	G. Muricy	05/IV/2003	1 metro
TOTAL <i>A. compressa</i> + <i>A. aff. compressa</i>		19			
<i>Amphimedon viridis</i>	Fleixeiras, CE	MNRJ 6085	E. Hajdu	10/VII/2002	
	Atol das Rocas, RN	MNRJ 2107	G. Muricy	25/II/1999	0,2 metros
		MNRJ 2129	G. Muricy	27/II/1999	1,5 metros
		MNRJ 2136	G. Muricy	05/III/1999	1 metro
		MNRJ 2159	F. Moraes	03/III/1999	
		MNRJ 2913	E. Vilanova	20/XI/1999	
		MNRJ 4480	G. Neves	___/XI/1999	
		MNRJ 4482	G. Neves	___/XI/1999	
		MNRJ 4484	G. Neves	___/XI/1999	
		MNRJ 6224	E. Hajdu, M. Ventura & U. Pinheiro	21/VIII/2002	2 – 3 metros
		MNRJ 6255	E. Hajdu, M. Ventura & U. Pinheiro	22/VIII/2002	
		MNRJ 6256	E. Hajdu, M. Ventura & U. Pinheiro	22/VIII/2002	
		MNRJ 6257	E. Hajdu, M. Ventura & U. Pinheiro	22/VIII/2002	
		MNRJ 6258	E. Hajdu, M. Ventura & U. Pinheiro	22/VIII/2002	
		MNRJ 6259	E. Hajdu, M. Ventura & U. Pinheiro	22/VIII/2002	
		MNRJ 6667	E. Hajdu, M. Ventura & U. Pinheiro	01/IX/2002	
	Recife, PE	MNRJ 7095	E. Esteves	02/I/2003	0,5 metro
		MNRJ 7097	E. Esteves	02/I/2003	0,3 metros
		MNRJ 7098	E. Esteves	02/I/2003	0,3 metros
		MNRJ 7108	E. Esteves	02/I/2003	0,5 metro
		MNRJ 7109	E. Esteves	02/I/2003	0,5 metro
	Tamandaré (Ponta dos Carneiros), PE	MNRJ 1525	E. Hajdu & G. Muricy		
	Salvador, BA	MNRJ 2659	E. Hajdu	03/VIII/1999	5 metros
	Abrolhos, BA	MNRJ 5495	E. Vilanova	04/III/2002	
		MNRJ 5748	E. Vilanova	03/II/2002	0,5 metro
	Mucugê, ES	MNRJ 5263	E. Hajdu	26/I/2002	Entre marés

<i>Amphimedon viridis</i>	Búzios, RJ	MNRJ 3968	J. Creed	04/IX/2000	
		MNRJ 3970	J. Creed	07/IX/2000	
		MNRJ 3972	J. Creed	30/XI/2000	
		MNRJ 5926	E. Vilanova	10/V/2002	3 – 6 metros
		MNRJ 5928	E. Vilanova	10/V/2002	3 – 6 metros
		MNRJ 5929	E. Vilanova	10/V/2002	3 – 6 metros
		MNRJ 5930	E. Vilanova	10/V/2002	3 – 6 metros
		MNRJ 5931	E. Vilanova	10/V/2002	3 – 6 metros
		MNRJ 5934	E. Hajdu	10/V/2002	2 metros
	Angra dos Reis, RJ	MNRJ 7112	T. Vieiraltves	19/XII/2002	1 – 2 metros
	Parati, RJ	MNRJ 7586	E. Hajdu	04/X/2003	2 metros
		MNRJ 7587	E. Hajdu	04/X/2003	5 metros
	Ubatuba (Picinguaba), SP	MNRJ 2872	E. Hajdu	07/XI/1999	1 metro
	São Sebastião, SP	MNRJ 1699	E. Hajdu	29/IV/1997	2,5 metros
		MNRJ 2016	E. Hajdu	06/II/1999	
		MNRJ 6759	C. Campos	26/III/2002	2 metros
TOTAL <i>A. viridis</i>		42			
TOTAL GERAL		61			

Legenda: Em **negrito** = amostras de *A. viridis* e de *A. compressa* que foram analisadas por ambos os métodos moleculares e morfológicos.

Metodologia para a análise morfológica

Após a seleção dos espécimes usados para o estudo, foi verificado que a maioria das amostras estava conservada em etanol 96%, havendo somente as amostras de Cuba que após a coleta passaram por um curto período em etanol 96%, mas por causa da escassez do reagente elas tiveram de ser secas em temperatura ambiente.

Um fragmento de cada uma das amostras foi retirado e colocado em um frasco de vidro com o número de tombo na tampa, foram anotados também os dados pertinentes a coleta, como profundidade em que se encontrava a amostra em questão, o local de coleta, a data de coleta, a coloração in vivo, a coloração após conservação no reagente e o nome do coletor.

O estudo da taxonomia teve como base a análise da morfologia externa dos espécimes, que consistiu na observação do tamanho e forma do fragmento, na cor do espécime vivo e após ser fixado. Também foram analisadas a superfície e ornamentação da esponja, o formato, a variação de tamanho, a localização dos ósculos e poros e a variação de cores no interior e exterior dos ósculos.

A análise da morfologia interna consiste no estudo das espículas e da organização do esqueleto.

Estudo das espículas

Para que possa ser feito o estudo das espículas, foi escolhido o método de dissociação espicular que ofereceu um resultado mais limpo, onde em um tubo de ensaio limpo foi posto um fragmento pequeno da esponja, nele foi gotejado ácido nítrico 65%, levado ao fogo, até a completa dissociação da matéria orgânica. O material restante é lavado quatro vezes com água destilada e quatro vezes com etanol 96%, sendo o tubo centrifugado entre as lavagens. Após a lavagem do material restante colocou-se uma alíquota do material na lâmina e após a secagem total do álcool foi posto o Etellan e a lamínula sobre o material seco.

Estudo da organização do esqueleto

O estudo da organização do esqueleto é feito a partir da análise de cortes histológicos. Foram feitos cortes tangenciais para analisar o ectossoma e cortes perpendiculares para analisar o arranjo das espículas no ectossoma e o coanossoma.

Um fragmento da esponja é desidratado em etanol 96% por cerca de 30 minutos e em dois banhos sucessivos de 30 minutos em butanol absoluto. Em seguida, os fragmentos foram clarificados em dois banhos sucessivos de 30 minutos em Xilol (VETEC) e incluídos em parafina líquida, sendo mantidos por 24 horas em estufa, a uma temperatura de aproximadamente 60°C. Quando retirados da estufa, os fragmentos foram incluídos em blocos de parafina montados com auxílio de micrótomo de Ranvier. Após a solidificação do bloco de parafina, foram feitos cortes finos com bisturi, os quais foram colocados sobre lâminas, gotejando-se Xilol para dissolver totalmente a parafina. Após a retirada da parafina o corte é coberto com algumas gotas de Entellan (MERCK) e lamínula.

Observação das lâminas

As lâminas de esqueleto e as de espículas foram observadas em um microscópio óptico Zeiss Jena equipado com ocular micrométrica. Com relação à análise das lâminas espiculares foram feitas trinta mensurações de cada tipo de espícula por espécime, indicando as dimensões mínima-média-máxima. Todas as micrometrias são dadas em micrômetros (μm).

A observação e documentação das espículas e do arranjo esquelético foram realizadas em microscópio óptico Nikon Eclipse E200 equipado com máquina fotográfica digital Nikon E995 e câmara clara.

As lâminas de esqueleto foram observadas, visando obter dados sobre a organização espicular, a reticulação das fibras de espongina e o tamanho e conformação dos poros.

Metodologia para a análise molecular

O primeiro passo foi retirar os simbiossitos dos fragmentos das esponjas antes da adição da solução de preservação.

No caso das amostras coletadas frescas, o fragmento limpo foi colocado em tubos de polipropileno de 15 mL contendo solução de lise [hidroclorato de guanidina 4 M (PHARMACIA) em 50 mM Tris-HCl pH 8,0 (PHARMACIA); 0,05 M EDTA (GIBCO) e 0,5% N'-Lauryl Sarcosina (MERCK)], na concentração de 1 volume de amostra para 5 volumes de solução de lise. A amostra foi então homogeneizada e estocada em freezer -20°C ou ainda, provisoriamente, em temperatura ambiente.

Preservação das amostras em diversos fixadores

Para que a análise molecular fosse bem sucedida investigou-se o melhor método de preservação no campo para amostras de *A. viridis*, posto que nem sempre o material fresco é acessível aos pesquisadores da área genética, que não raro dependem de material já coletado e depositado em coleções de museus. A depender do método de fixação e do tempo em coleção, o DNA estará mais ou menos degradado, sendo por vezes impossível conduzir um estudo de variabilidade

genética (ARRIGHI *et al.*, 1968, POST *et al.*, 1993, REISS *et al.*, 1995, DILON *et al.*, 1996, HAMMOND *et al.*, 1996; LÔBO-HAJDU *et al.*, 2001).

Cada fragmento coletado foi subdividido em seis frações iguais, e preservados em 6 diferentes meios: 1) seco ao ar, 2) 70% etanol, 3) 96% etanol, 4) congelado em gelo seco (CO₂ sólido), 5) solução de lise ou 6) silica gel (MERCK) (Figura 3). As amostras foram preservadas nos fixadores por um período mínimo de uma semana. Com exceção das amostras secas que foram armazenadas na estufa (CID, modelo 311CG) a temperatura de 60 graus para uma rápida secagem, e do material conservado no gelo seco que foi imediatamente depositado no freezer - 80°C (Forma Scientific, modelo 923), o restante das amostras foram estocadas a temperatura ambiente.

Para obter uma maior reprodutibilidade dos resultados foram feitas oito séries, cada qual contendo seis tubos, onde as duas primeiras séries tiveram seu DNA extraído após o período de uma semana o restante foi extraído em quinze, trinta e sessenta dias depois.

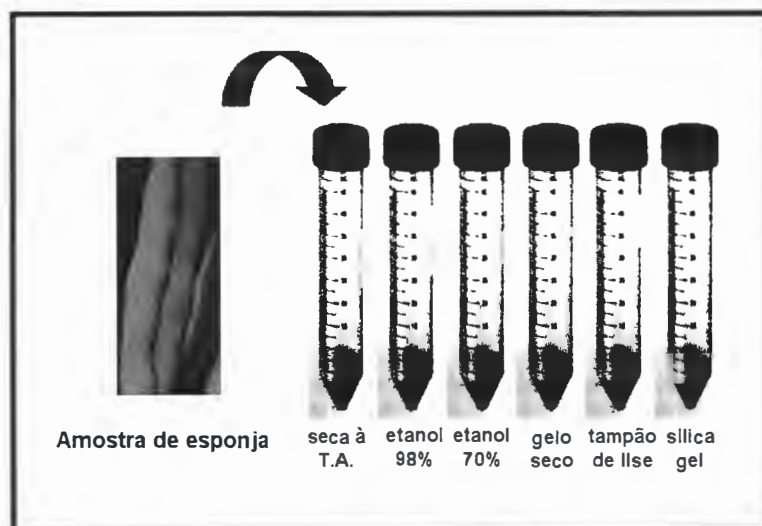


Figura 3: Esquema apresentando os diferentes tipos de fixadores usados.

Extração do DNA genômico total

Todas as amostras foram homogeneizadas em solução de lise com auxílio de bastão de vidro. Antes de iniciar a extração do DNA genômico total, foi acrescentado nos homogeneizados 0,1% de β -Mercaptoetanol (PHARMACIA), sendo os homogeneizados em seguida incubados a 65°C por um período de uma hora e depois estocados a -20°C.

O homogeneizado foi descongelado, centrifugado em centrífuga clínica (Fanem Excelsa Baby II, modelo 206-R) por 15 minutos a uma rotação de 8000 rpm, o esperado foi a precipitação de fragmentos menores da esponja, bem como escleras que estivessem soltas na solução. Ao término da centrifugação uma alíquota de 1mL do homogeneizado foi retirado e colocado em um tubo limpo de polipropileno de 1,5mL. Visando obter uma amostra mais limpa o tubo foi centrifugado à 10.000 rpm por 5 minutos.

Após a centrifugação um volume de 600µL foi retirado e transferido para um novo tubo de 1,5 mL. Foi acrescentado um volume igual de fenol-clorofórmio (concentração de 1:1), fez-se a inversão dos tubos e foi retirado todo o sobrenadante, este novamente foi para um tubo limpo de 1,5mL. No tubo novo é acrescentado clorofórmio (VETEC), este por sua vez terá a função de eliminar qualquer vestígio de fenol que possa ter ficado na solução. Com a mistura dos tubos por inversão, eles foram centrifugados a 6000 rpm por 4 minutos repete-se a aplicação do clorofórmio.

Ao retirar o clorofórmio, foi acrescentado 1mL de etanol absoluto (VETEC) e a amostra ficou em repouso *overnight* a -20°C . No dia seguinte, os tubos que possuíam pellet evidente foram retirados com o uso de uma ponteira de 200µL e o restante do conteúdo do tubo foi centrifugado a 6000rpm por 4 minutos. Tanto o pellet que foi retirado com a ponteira, como o que ficou preso no fundo do tubo após a centrifugação foram lavados com etanol 70% e depois secos. Os pellets “pescados” foram devolvidos para os tubos originais e foram então dissolvidos em água Milli-Q ou TE mais 200µg/ml RNase A (GIBCO BRL) e incubados a 37°C por 2 horas (Figura 4).

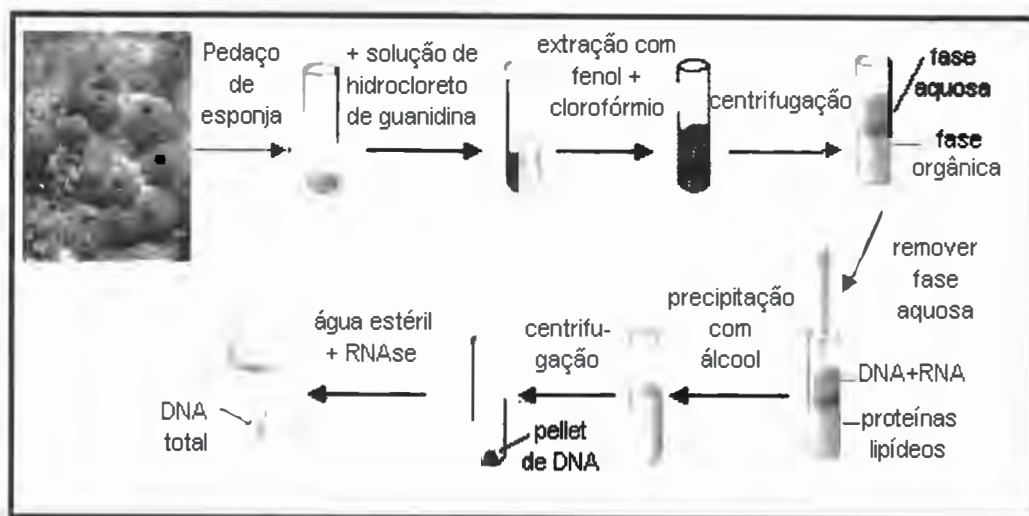


Figura 4: Esquema do processo de extração de DNA genômico total

Quantificação do DNA genômico total por eletroforese em gel de agarose 0,8%

A quantificação do DNA foi feita usando-se um gel de agarose (USB) na concentração de 0,8% imerso em uma solução de TBE 0,5X (Tris-borato 0,45 M e EDTA 0,01M). Após a corrida na cuba horizontal (Horizon 5.8, Life Technologies), o gel foi incubado com 0,6µg/ml de brometo de etídio (GIBCO BRL) e visualizado sobre uma luz UV (UVP - 254nm, modelo TM-20). No UV pôde-se comparar o produto extraído com fragmentos de DNA genômico de bacteriófago lambda (GIBCO BRL) nas concentrações de 10ng/µl e 50ng/µl (Figura 5).

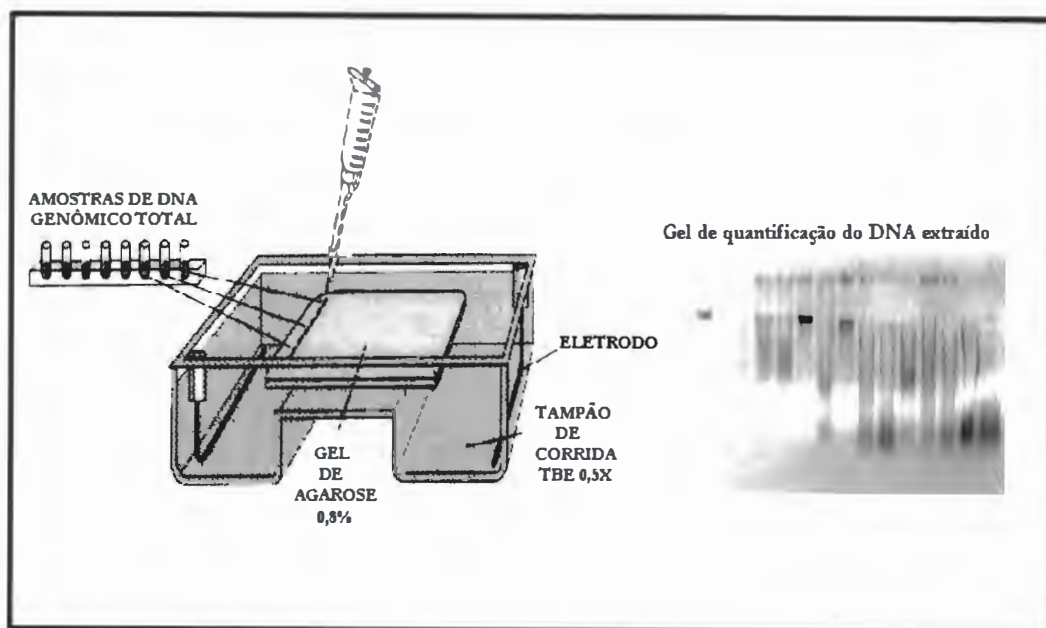


Figura 5: Esquema da quantificação do DNA em gel de agarose a 0.8%.

Para avaliarmos o grau de qualidade do DNA, foi usado o registro feito por AMOS & HOELZEL (1991) com algumas alterações.

Reação de amplificação por PCR

A partir do momento que todas as amostras foram quantificadas, o próximo passo é a amplificação do DNA, utilizando a técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction)(SAIKI *et al.*, 1985). Esta técnica consiste em fazer várias cópias múltiplas de uma determinada região da dupla fita de DNA, usando dois oligonucleotídeos específicos desenhados para que suas terminações 3' estejam direcionadas em sentido opostos (KLEPPE *et al.*, 1971).

A reação de PCR tem como vantagem não precisar de muito material para que funcione e mesmo que necessite somente de uma pequena fração de material para ser amplificado o produto de PCR pode ser posteriormente seqüenciado ou usado como sonda (MERCEREAU-PUIJALON *et al.*, 1991). Esta reação tem como função fazer a replicação do material genético, como ocorre com as células pela DNA polimerase (KORNBERG, 1980). A reação ocorre em três etapas estipuladas a partir da variação de temperatura. A primeira etapa é a da desnaturação da dupla fita de DNA, separando assim as fitas complementares. Na segunda etapa ocorre o resfriamento até chegar a temperatura ideal para o anelamento dos oligonucleotídeos área complementar na fita molde. E a terceira etapa consiste em levar a uma temperatura final para ocorrer a extensão do produto amplificado (McPHERSON & MOLLER, 2000).

A região de interesse para a análise da variabilidade genética desta espécie pertence à família do RNA ribossomal (RNAr), que consiste de centenas de cópias múltiplas da unidade transcricional. Nesta região há um espaçador externo transcrito (ETS) na extremidade 5' do transcrito, os três genes para os RNA ribossomais 18S, 5,8S e 28S e os espaçadores não transcritos (NTS), que somente intercalam as repetições dentro do mesmo cromossomo. Mas no RNAr as regiões escolhidas como alvo foram os dois espaçadores internos transcritos (ITS1 e ITS2), que são conhecidos por não terem nenhuma função específica e por acumularem uma grande quantidade de mutações. Essas características são de extrema

importância para a análise da variabilidade inter e intraespecífica dos organismos (Figura 6).

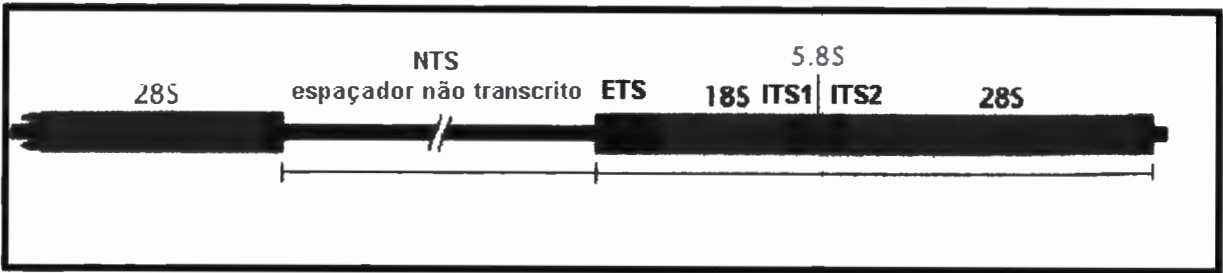


Figura 6: Esquema da organização gênica da unidade transcricional do RNAr

Para ser feita a amplificação das duas regiões de ITS do RNA ribossomal nuclear (RNAr) (ITS1 e ITS2), foram usados dois pares de oligonucleotídeos (primers): 18S Forward /5'-TCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCG-3', 5,8S Reverse /5'-GCGTTCAAAGACTCGATGATTC-3'; e 5,8 S Forward /5'-GAATCATCGAGTCTTTGAGC C-3', 28 S Reverse /5'-GTTAGTTTCTTTTCCTCCGCTT-3' (Figura 7).

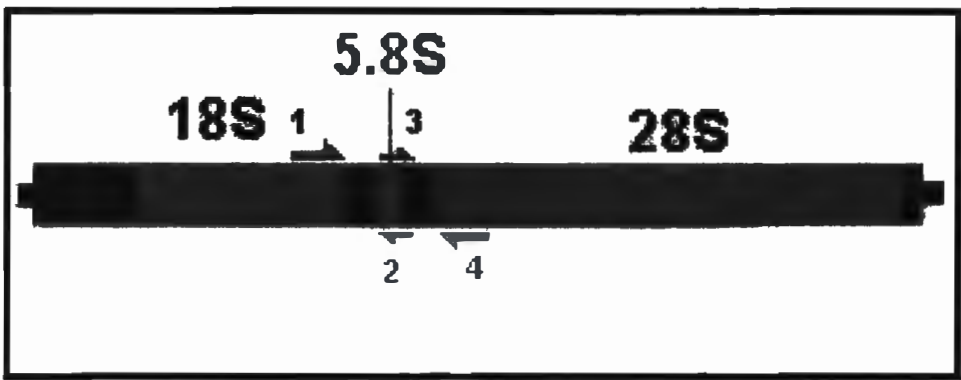


Figura 7: Esquema apresentando a escolha dos oligonucleotídeos, onde: 1 e 2 equivalem aos oligonucleotídeos de ITS1 e 3 e 4 ao ITS2.

Em cada mistura para a reação de PCR foi usado um volume final de 50μl contendo, 10ng de DNA genômico, tampão de reação (10mM KCl, 20mM Tris-HCl pH 8.8, 10mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Triton-X-100, 100mg/ml gelatina), 3mM MgSO₄, 200μM dNTPs (PHARMACIA), 80ng de cada oligonucleotídeo e 1 unidade de Pfu DNA polymerase (BIOTOOLS). Para ocorrer a reação de PCR foi necessário o uso de um termociclador (ICYCLER BIORAD), onde foi criado um programa intitulado 50ANM45CY com o objetivo de fazer uma desnaturação inicial de 5 minutos a 96°C, seguida de 45 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 50°C e 1 minuto a 72°C, tendo um passo de 5 minutos a 72°C e um passo final de 1 hora a 15°C (Figura 8).

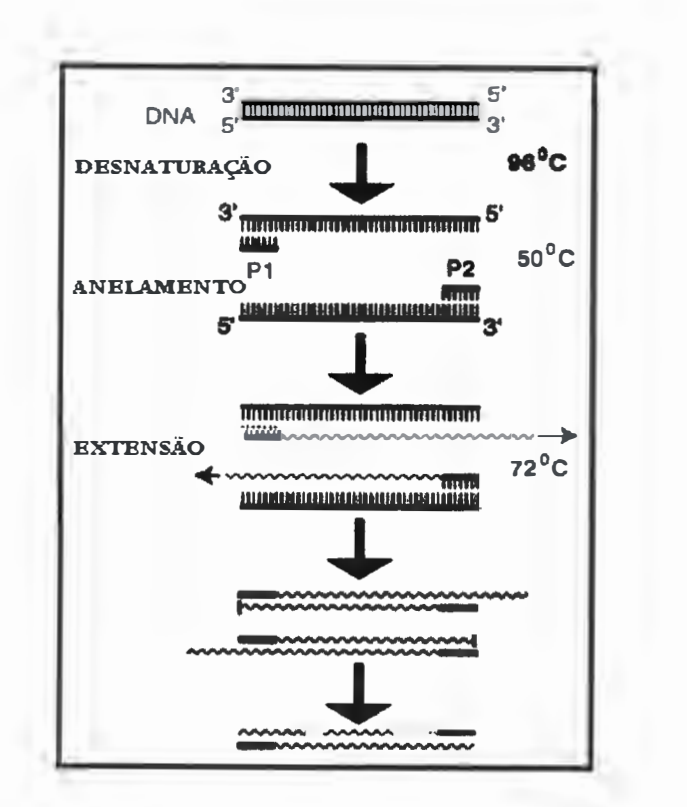


Figura 8: Etapas da reação de PCR.

Visualização dos produtos da PCR em gel de agarose 2%

Para analisar se a reação funcionou ou não, o produto de PCR foi aplicado em um gel de agarose na concentração de 2% imerso em TBE 0,5X. Foi esperado visualizar a separação das bandas amplificadas com o auxílio do brometo de etídeo e do UV. O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado comparando-os com um marcador de DNA padrão (Figura 9).

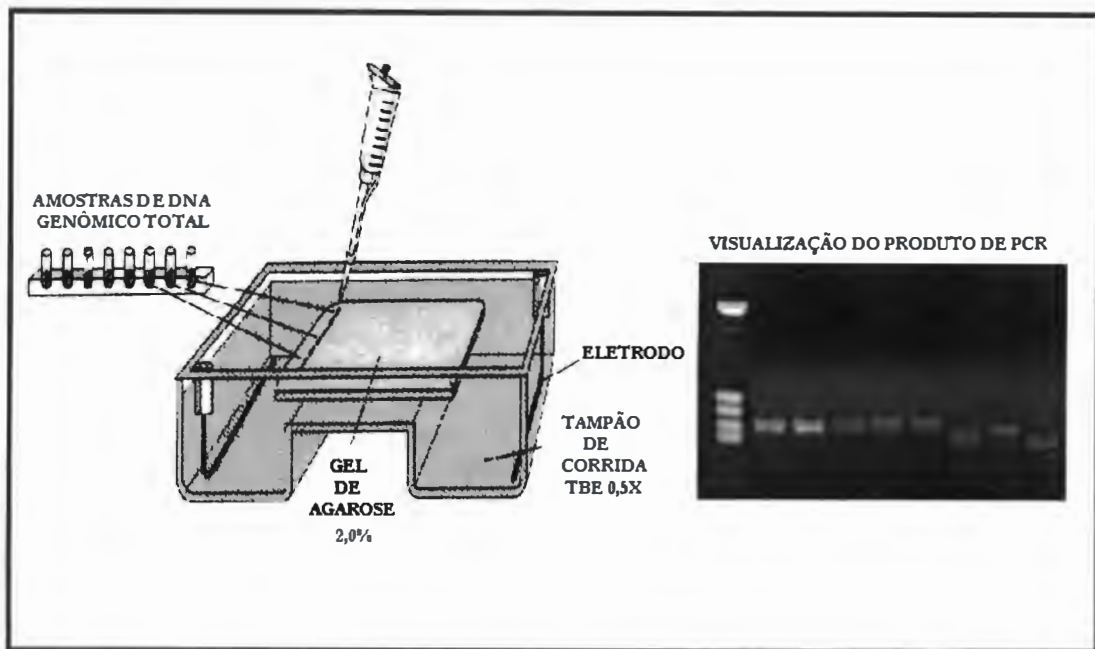


Figura 9: Esquema da visualização dos produtos da PCR em gel de agarose a 2%.

Técnica do SSCP para análise da variabilidade dos fragmentos amplificados por PCR

A técnica de SSCP (Polimorfismo de Conformação de Fita Simples) permite detectar mutações no produto amplificado. Esta técnica é baseada na diferença no padrão de migração da fita simples de DNA em um gel não desnaturante de acrilamida, onde a migração depende da conformação da sequência e da fita

simples, que por sua vez depende do tamanho da fita simples e do número de pares de bases existentes (ORITA *et al.*, 1989)(Figura 10).

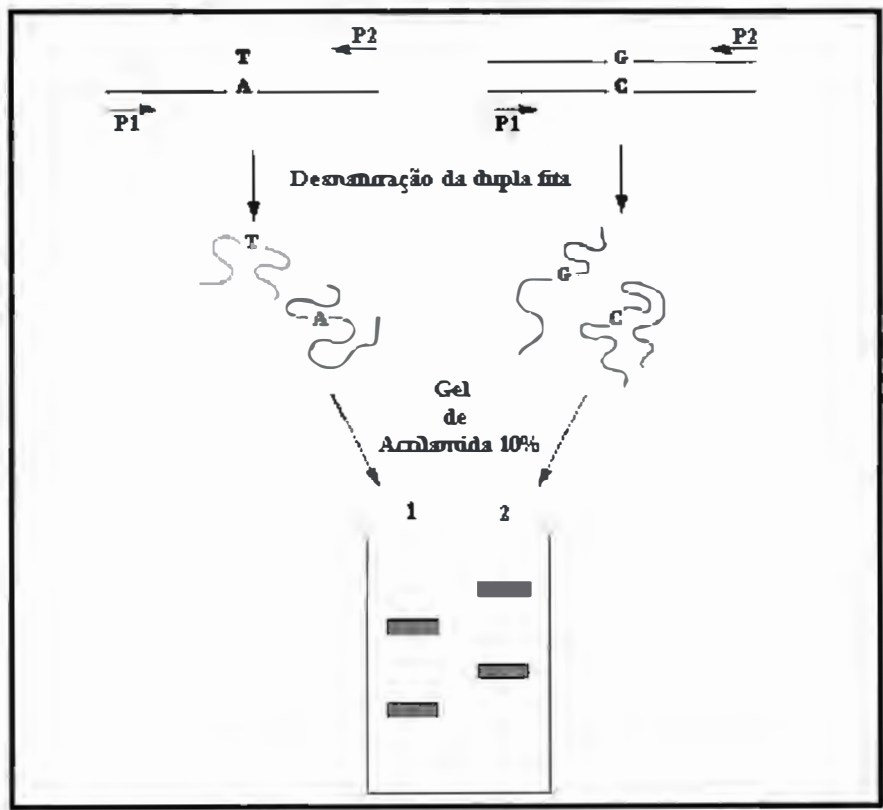


Figura 10: Esquema da técnica do polimorfismo de conformação de fita simples (SSCP).

Para um melhor resultado no SSCP, o produto de PCR deve ser desnaturado, pois se pode observar que quando aplicado em um gel de poliacrilamida a fita simples de DNA migra mais devagar que quando em dupla fita, isso ocorre por causa das ligações ocasionadas pela tentativa de manterem-se as pontes de hidrogênio dentro da mesma fita, ocasionando um dobramento que vai alterar sua estrutura secundária (ORITA *et al.*, 1989).

Qualquer alteração na seqüência da fita simples de DNA, como deleções, substituições ou inserções de nucleotídeos, podem acarretar em alterações nas

conformações da fita simples e na migração das mesmas no gel. Quanto maior for as alterações nas seqüências de nucleotídeos, maior será o acúmulo de mutações durante o processo evolutivo (SUNNUCKS *et al.*, 2000; BROWN, 2003). Como é sabido que uma das principais características do ITS é acumular mutações durante o processo evolutivo, a técnica de SSCP foi considerada apropriada para o estudo da variabilidade em esponjas marinhas (LÔBO-HAJDU, no prelo).

Há diversos fatores que podem afetar a análise do SSCP, tais como a temperatura do gel durante a eletroforese, a concentração do tampão de desnaturação e a presença de agentes desnaturantes à alta temperatura (ORITA *et al.*, 1989).

Para o uso da técnica de SSCP, foi utilizado 3µL do produto amplificado no PCR, acrescido de um volume igual de tampão de desnaturação, composto por 95% de Formamida (MERCK), 100mM EDTA (MERCK) e corante (0,05% bromofenol e 0,05% xileno cianol), fervidos por 5 min a 95°C e colocados imediatamente no gelo para manter a desnaturação. Essas amostras preparadas foram aplicadas em um gel de poli-acrilamida 8% (8,0 mL de solução de acrilamida: bis acrilamida 30% (29:1) – GIBCO BRL, 6,0 mL tampão TBE 5X, 15,74 mL de água deionizada, 0,25 mL de persulfato de amônio 10% (APS – MERCK), e 10 µL de N’N’N’N’tetrametiletilenodiamina (TEMED – BIO-RAD), (SAMBROOK *et al.*, 1989). O tampão utilizado para a corrida eletroforética é o TBE 0,5X.

O gel de acrilamida não desnaturante foi mantido resfriado no freezer à – 20°C, desde a aplicação das amostras até o término da corrida, ele correu em uma

cuba de eletroforese vertical modelo v16-2 (LIFE TECHNOLOGIES) a 150 volts por 22 horas.

Método de coloração do gel de poliacrilamida por prata

Após uma corrida de 22 horas, os géis foram retirados das placas de vidro e armazenados por um período mínimo de 30 minutos em soluções de Ácido Acético Glacial na concentração de 10%. Após este período, a solução de Ácido Acético é retirada e os géis são lavados duas vezes com água deionizada (Milli-Q) e são imersos na solução de coloração (0,1% nitrato de prata, 0,15% formaldeído – ambos MERCK) por um período de 30 minutos. Os géis são logo em seguida lavados por 10 segundos com água Milli-Q e logo imerso na solução de revelação (3% Na_2CO_3 anidro, 0,15% formaldeído e 0,02% tiosulfato de sódio 10 mg/mL – MERCK) até aparecerem às bandas, isto ocorre pois o nitrato de prata tem carga positiva e se liga ao DNA, com carga negativa. Para parar o processo de revelação, o gel ficou imerso em soluções de Ácido Acético Glacial na concentração de 10% (BASSAM *et al.*, 1991).

Resultados e discussão

Descrições morfológicas

Família Niphatidae Van Soest, 1980

Definição: Haplosclerida com esqueleto ectossomal de fibras multiespiculares. Esqueleto coanossomal de fibras multiespiculares preenchidas por óxeas, muitas vezes variáveis para estrongilóxeas ou estilos. Microscleras, quando presentes, são sigmas ou micróxeas (DESQUEYROUX-FAÚNDEZ & VALENTINE, 2002).

Gênero *Amphimedon* Duchassaing & Michelotti, 1864

Amphimedon Duchassaing & Michelotti, 1864: 78; de Laubenfels, 1936a: 45; Van Soest, 1980: 26.

Hemihaliclona Burton, 1937: 18, pl. I, fig. 7.

Espécie-tipo: *Amphimedon compressa* Duchassaing & Michelotti, 1864 (subseqüente designação por de Laubenfels, 1936a).

Diagnose: Formas irregularmente massivas, lameladas, flabeliformes ou de crescimento ramificado, com numerosos ósculos dispostos linearmente sobre as margens ou distribuídos sobre ramos. Esqueleto ectossomal constituído por uma rede tangencial tridimensional de fibras secundárias com malhas arredondadas de

tamanho uniforme, cobertas por fina membrana. Esqueleto coanossomal irregular, difuso, com rede plumosa radial de fibras primárias multiespiculares ramificadas que protraem discretamente na superfície, resultando numa superfície aparentemente lisa, irregularmente conectadas por fibras secundárias multiespiculares. Espongina abundante. Megascleras são óxeas com extremidades frequentemente modificadas ou estrangiliformes. Microscleras ausentes (Adaptado de VAN SOEST, 1980 e DESQUEYROUX-FAÚNDEZ & VALENTINE, 2002).

***Amphimedon viridis* Duchassaing & Michelotti, 1864**

(Prancha 1)

Amphimedon viridis Duchassaing & Michelotti, 1864: 81, pl. 16, figs. 2,3.

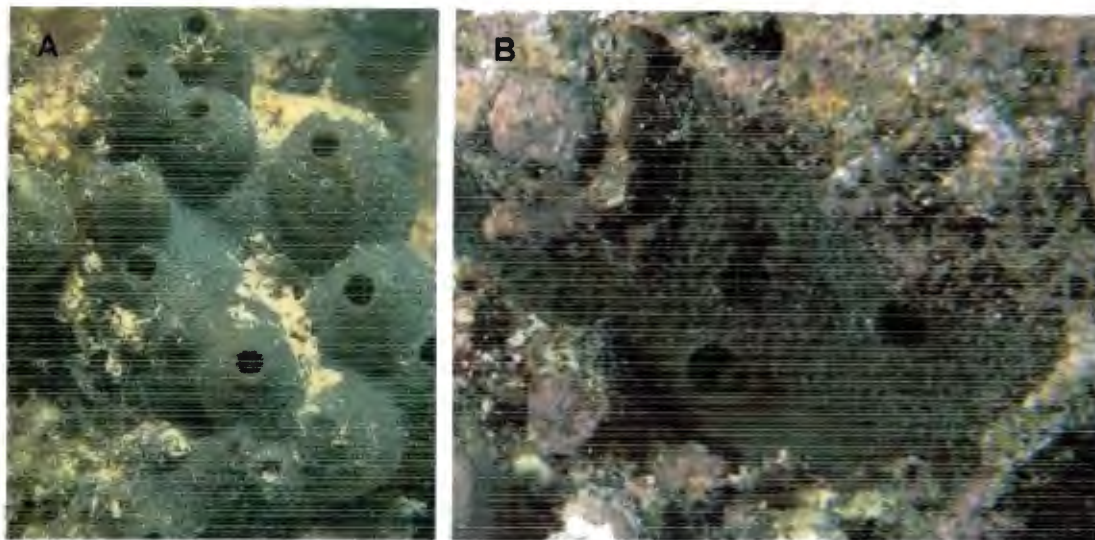
Haliclona viridis de Laubenfels, 1936a: 42; Pomponi, 1976: 218, figs 1-3.

Hemihaliclona viridis Burton, 1937: 18, pl. 1, fig. 7.

Pachychalina mollis Wilson, 1902: 390; de Laubenfels, 1936a.

Pachychalina micropora Duchassaing & Michelotti, 1864: 337; Wells et al., 1960.

Para sinónimas adicionais veja WIEDENMAYER (1977) e ZEA (1987).



Prancha 1: Indivíduos de *Amphimedon viridis* “in situ”. A: *A. viridis*, Arraial do Cabo (RJ); B: *A. viridis*, Atol das Rocas (RN). Fotos E. Hajdu.

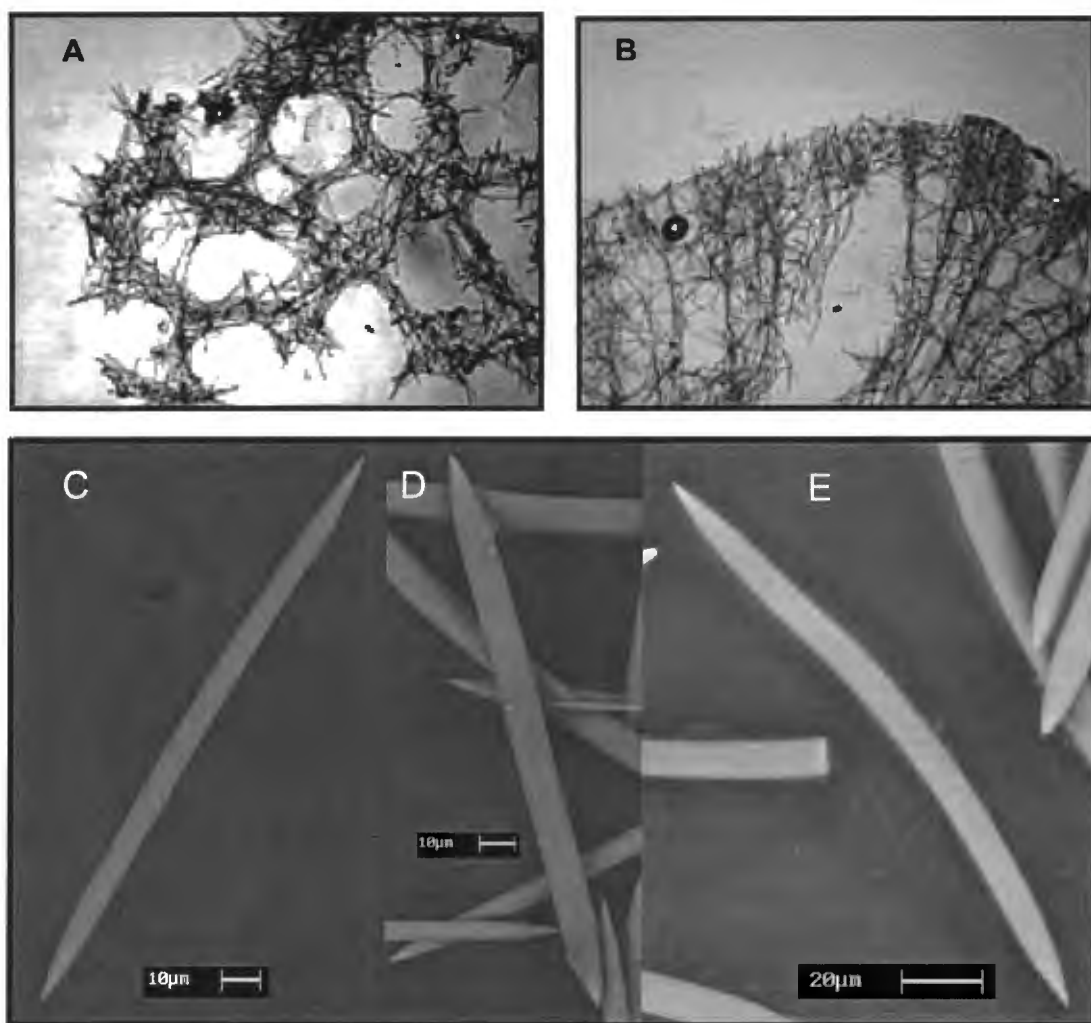
Material examinado: Veja Tabela 1 do Material e Métodos (amostras em **negrito** foram estudadas também com base em caracteres morfológicos).

Descrição: Não se oferece uma descrição detalhada da espécie aqui, que foi recentemente descrita para o Brasil por diversos autores (MURICY & RIBEIRO, 1999; MORAES, 2000; PINHEIRO et al., submetido). Para descrições de registros efetuados no Caribe veja WIEDENMAYER (1977), VAN SOEST (1980) e ZEA (1987). Essencialmente, a espécie varia em torno de poucas tonalidades de verde ao longo de grande parte do litoral brasileiro. Sua forma mais costumeira é a maciça, com ósculos (ca. 5mm de diâmetro) elevados em pequenas projeções vulcaniformes, mas projeções lobadas, e até mesmo digitiformes curtas podem estar presentes. Da mesma forma, espécimes completamente lisos também

ocorrem. Os espécimes podem atingir grandes dimensões (> 20cm de comprimento, 7 de largura e 7 de espessura). Sua consistência é macia, com alguma fragilidade que se traduz em aspecto esfarelante após a coleta e manuseio. Produz muco considerável.

Arquitetura esquelética: O esqueleto ectossomal é composto por uma reticulação paratangencial de feixes multiespiculares que formam malhas arredondadas conspícuas (prancha 2A). O arranjo é parcialmente obscurecido por megascleras dispostas obliquamente aos feixes. O arranjo coanossomal é plumoreticulado organizado em feixes primários multiespiculares ascendentes e paralelos uns aos outros, conectados por feixes secundários, transversais e multiespiculares (prancha 2B). Os feixes primários projetam-se além da superfície da esponja. Megascleras dispostas de forma confusa conferem alguma desorganização ao padrão geral, que no mais, lembra uma escada quase perfeita. Espongina inconspícua.

Espículas (prancha 2C-E): Óxeas retas a curvas, com pontas gradual ou abruptamente aguçadas ou telescópicas, variando de delgadas a robustas. Dimensões são dadas na Tabela 2.



Prancha 2: *Amphimedon viridis* Duchassaing & Michelotti, 1864. A, B. Arquitetura esquelética de MNRJ 7112. A, Seção tangencial à superfície mostrando arranjo ectossomal composto de malhas arredondadas. B, Seção perpendicular à superfície mostrando fibras primárias ascendentes protraindo na superfície e secundárias transversais às primárias. C-E. Componente espicular de MNRJ 1525. C, Óxea delgada, fusiforme e levemente curva..D, Óxea robusta, reta, de diâmetro homogêneo e afilamento abrupto. E, Óxea robusta, de curvatura bem marcada.

Tabela 2: Mensurações micrométricas de *Amphimedon viridis* Duchassaing & Michelotti, 1864. Medidas (mínima-média-máxima) são dadas em micrômetros (µm). Comprimento / espessura. N = 30.

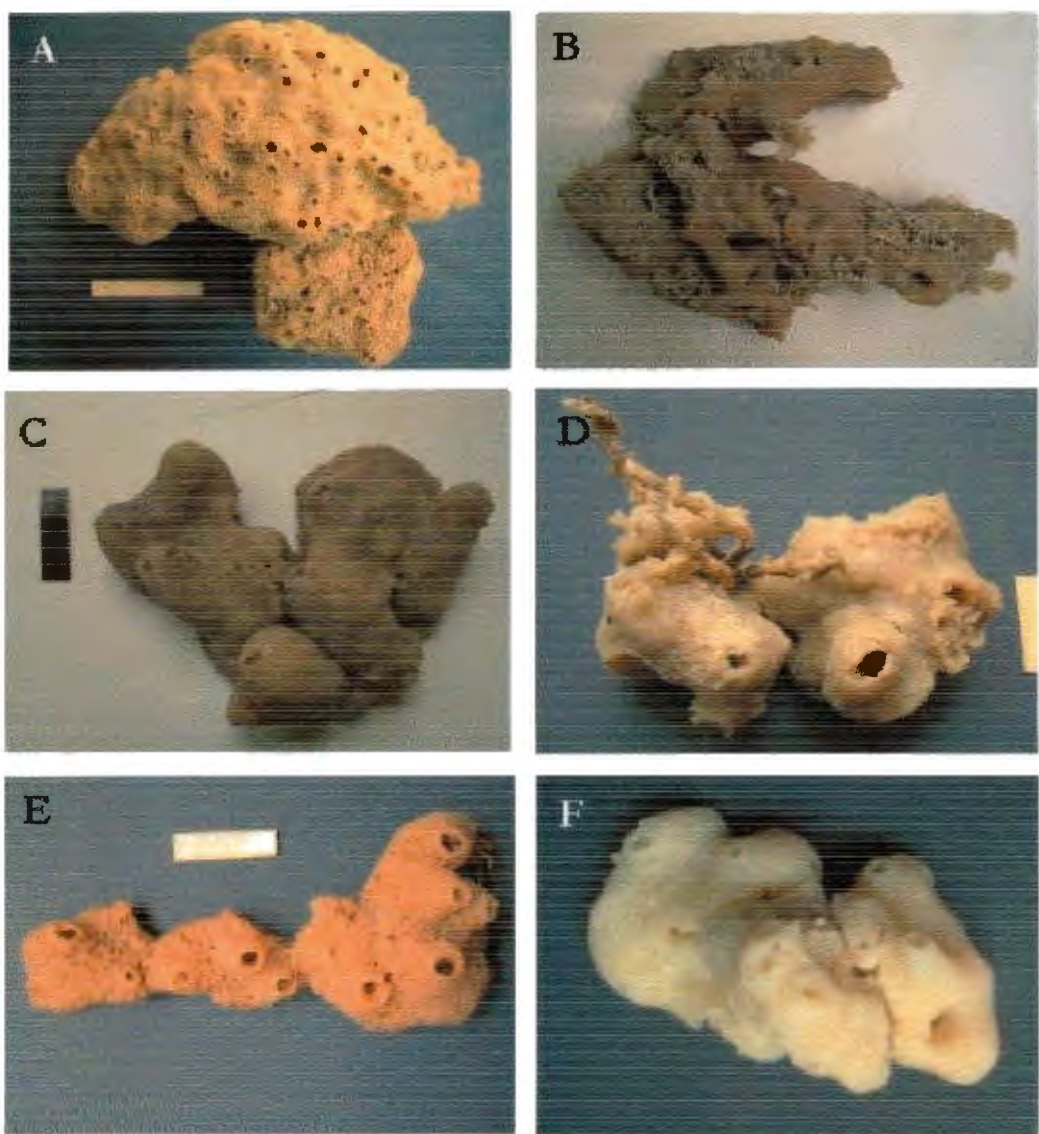
Nº de registro	Mensurações oxeas	Mensurações estilos
MNRJ 1525	158,4- <u>179,0</u> - 194,4/2,4- <u>10,7</u> -12,5	Não visualizado
MNRJ 1699	169,0- <u>179,1</u> -192,0 / 8,4- <u>10,8</u> -13,2	180,0/ 12,0 (N= 1)
MNRJ 2016	<u>93,6</u> - <u>139,2</u> - <u>175,2</u> / 2,4- <u>6,8</u> -12,0	69,6-127,2 / 3,6-7,2 (N =2)
MNRJ 2136	108,0- <u>119,7</u> -132,0 / 2,4- <u>2,4</u> -2,9	Não visualizado
MNRJ 2659	163,2- <u>175,7</u> -192,0 / 8,4- <u>11,4</u> -12,8	156,0-160,8 / 12,0 (N= 2)
MNRJ 2872	132,0- <u>173,5</u> -189,5 / 2,4- <u>9,6</u> -14,4	180,0 / 15,6 (N= 1)
MNRJ 5495	76,8- <u>85,4</u> -98,4 / 1,2- <u>2,3</u> -2,9	Não visualizado
MNRJ 5930	120,0- <u>147,8</u> -168,0 / 2,4- <u>7,3</u> -9,6	120,0-139,2 / 7,2 (N= 2)
MNRJ 6085	129,6- <u>169,8</u> -182,4 / 4,8- <u>9,8</u> -12,0	168,0 / 9,6 (N= 1)
MNRJ 6257	105,6- <u>126,3</u> -213,6 / 2,4- <u>5,5</u> -9,6	98,4 / 4,8 (N= 1)
MNRJ 6259	81,6- <u>122,2</u> - 192,0 / 0,7- <u>2,9</u> - 8,4	110,4-124,8 / 2,4-3,6 (N =2)
MNRJ 7095	175,2- <u>190,3</u> -206,4 / 7,2- <u>10,8</u> -12,5	177,6-206,4 / 10,8-12,0 (N= 2)
MNRJ 7586	112,8- <u>155,2</u> -170,4 / 6,0- <u>8,9</u> -10,8	139,2-153,6 / 8,4-9,6 (N= 2)
MNRJ 7587	93,6- <u>170,7</u> -194,4 / 3,6- <u>8,6</u> -13,2	165,6 / 8,4 (N = 1)

Distribuição Geográfica. Atlântico Ocidental: Desde a Carolina do Norte, EUA (WELLS et al., 1960) até São Sebastião, São Paulo, Brasil (MURICY & RIBEIRO, 1999; PINHEIRO et al., submetido); Indo-Pacífico (BURTON, 1937 como *Hemihaliclona viridis*, DE LAUBENFELS, 1954). Para maior detalhamento das localidades de ocorrência no Caribe veja VAN SOEST (1980) e ZEA (1987); para localidades no Brasil veja, por exemplo, MURICY et al. (1991), MURICY & RIBEIRO (1999), MURICY & SILVA (1999), SARMENTO & CORREIA (2002), MORAES, VILANOVA & MURICY (2003).

Ecologia: substratos consolidados/rochosos intertidais e no interior de lagunas, em raízes de vegetação de mangues e recifes (VAN SOEST, 1980); em substratos rochosos do sublitoral (1-8 m), as vezes exposta à sedimentação (MURICY & RIBEIRO, 1999). Relativamente tolerante à poluição doméstica (MURICY et al., 1991).

Tabela 3. Mensurações micrométricas das espículas, distribuição geográfica e batimétrica de *A. viridis* Duchassaing & Michelotti, 1864.

Citação bibliográfica	Mensurações óxeas (µm)		Localidade	Profundidade (m)
	Comprimento	Largura		
DUCHASSAING & MICHELOTTI (1864)	S/reg.	s/reg.	Guadalupe, São Domingos, Cuba, Bahamas	S/reg.
WILSON (1902)	140	2 - 7	Porto Rico	S/reg.
DE LAUBENFELS (1936) como <i>Haliclona viridis</i>	120 – 150	4 – 6	Dry Tortugas, Caribe	2 – 4
DE LAUBENFELS (1949) como <i>Haliclona viridis</i>	150	6	Bahamas, Caribe	S/reg.
LITTLE (1963) como <i>Haliclona viridis</i>	165,9	5,7	Golfo da Flórida, [29°51'N / 84°05' W]	6,5
WIEDENMAYER (1977) como <i>Haliclona (Amphimedon) viridis</i>	140	3	Bahamas	S/reg.
VAN SOEST (1980)	115- <u>153</u> -180	2- <u>6,8</u> -12	Curaçao, Margarita, Martinica Guadalupe, Porto Rico, Flórida	0, 5 – 2
ZEA (1987)	114- <u>141,1</u> -153	3,8- <u>4,7</u> -7,1	Colombia (Caribe), Isla Providencia	0,5 – 1
MURICY & RIBEIRO (1999)	110- <u>146</u> –175	1,3 - 7,5	Brasil: Angra dos Reis, Arraial do Cabo (RJ); São Sebastião (SP), Santa Cruz (ES) Tamandaré, Fernando de Noronha (PE)	1 – 5
MORAES (2000)	75 – <u>114</u> – 137	1 – <u>2,6</u> – 4	Brasil: Atol das Rocas,	0,2 – 5
PINHEIRO et al. (submetido)	146-210	5-14	Brasil: São Sebastião e Ilhabela (SP)	2,5-6



Prancha 3: *Amphimedon viridis* fixadas, coleção do Museu Nacional. A: MNRJ 1699; B: MNRJ 7112; C: MNRJ 2872; D: MNRJ 7107; E: MNRJ 6255; F: MNRJ 5495. Diferentes tonalidades de espécimes fixados podem ser oriundas de pigmentação exógena, decorrente de utilização de um recipiente para mais de uma espécie (E. IIAJDU, com. pess.). Referir-se à Tabela 1 para dados de coleta de cada espécime.

Amphimedon aff. *compressa* Duchassaing & Michelotti, 1864

(Prancha 4 e 5)

Amphimedon aff. *compressa* Duchassaing & Michelotti, 1864 - MORAES, 2000: 38; SARMENTO & CORREIA, 2002: 221 (como *A. compressa*); MORAES et al., 2003: 17-18.

Material examinado: Veja Tabela 1 do Material e Métodos (amostras em **negrito** foram estudadas também com base em caracteres morfológicos).

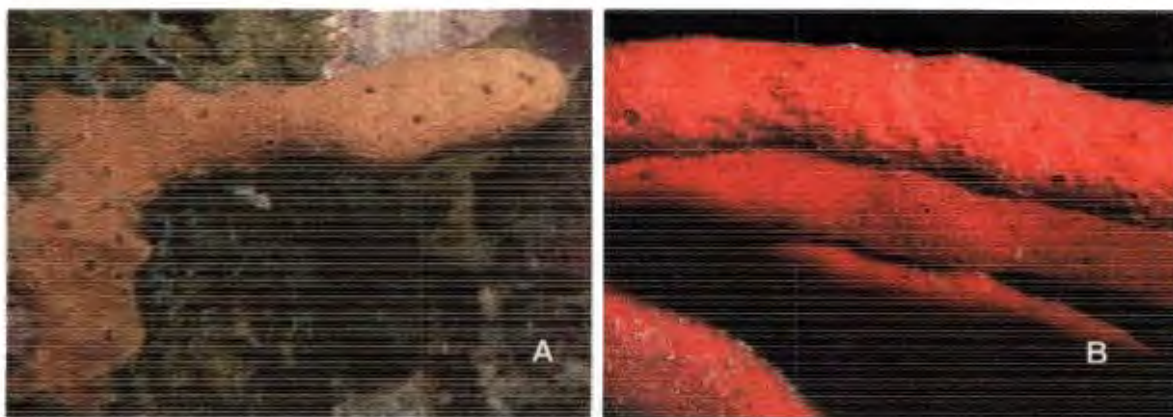
Descrição (prancha 6): Espécimes geralmente maciços, podendo atingir grandes dimensões (> 30cm de diâmetro e 4cm de espessura). A forma costuma incluir projeções vulcaniformes, freqüentemente arredondadas, onde se situam os ósculos (ca. 5mm de diâmetro). Espécimes desprovidos de projeções também ocorrem. A superfície apresenta uma reticulação visível ao olho nu. A consistência variou de macia à firme, e a cor em vida do roxo-avermelhado (mais comum no Atol das Rocas) ao vermelho-amarronzado (mais comum em Alagoas). Os espécimes de Alagoas são frágeis e esfarelentos, enquanto os do Atol das Rocas apesar de muito macios, não esfarelam facilmente. Para descrições de registros efetuados no Caribe veja WIEDENMAYER (1977), VAN SOEST (1980) e ZEA (1987).

Arquitetura esquelética (prancha 6): Esqueleto ectossomal formado por uma reticulação paratangencial de feixes multiespiculares formando malhas irregulares.

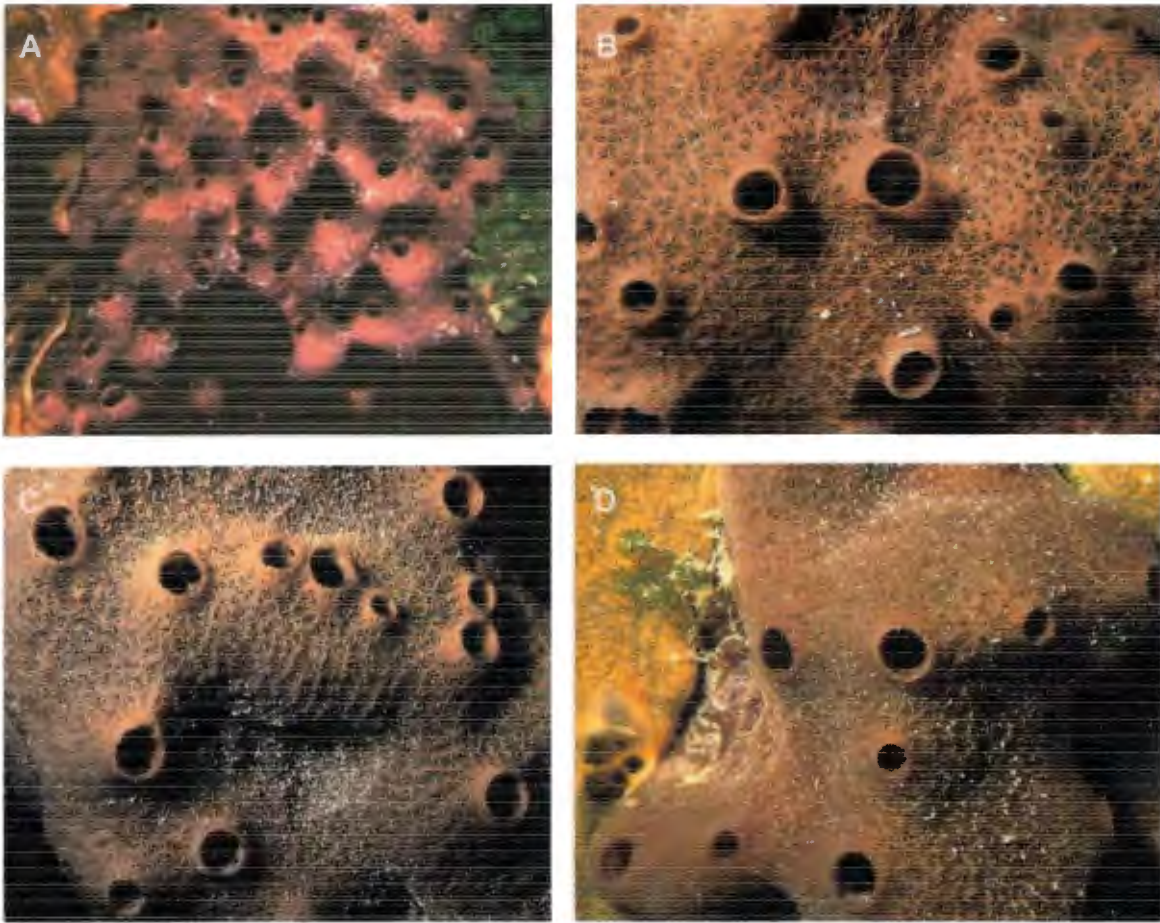
O arranjo coanossomal é do tipo plumo-reticulado, denso, composto de feixes primários ascendentes em padrão sinuoso irregular, divergindo com frequência, e ultrapassando discretamente a superfície da esponja. Feixes secundários interconectantes ocorrem com frequência, também sendo multiespiculares. Megascleras dispersas contribuem para mascarar o padrão de organização.

Espículas (prancha 6): Óxeas retas a curvas, delgadas, com pontas gradual ou abruptamente afiladas. Dimensões são dadas na Tabela 4.

Distribuição Geográfica. Atlântico Ocidental: Desde Cuba (CARTER, 1882 como *Chalina rubens*; presente estudo) até Ilha do Bonfim, Angra dos Reis, RJ, Brasil (presente estudo). Para maior detalhamento das localidades de ocorrência no Caribe veja VAN SOEST (1980) e ZEA (1987).

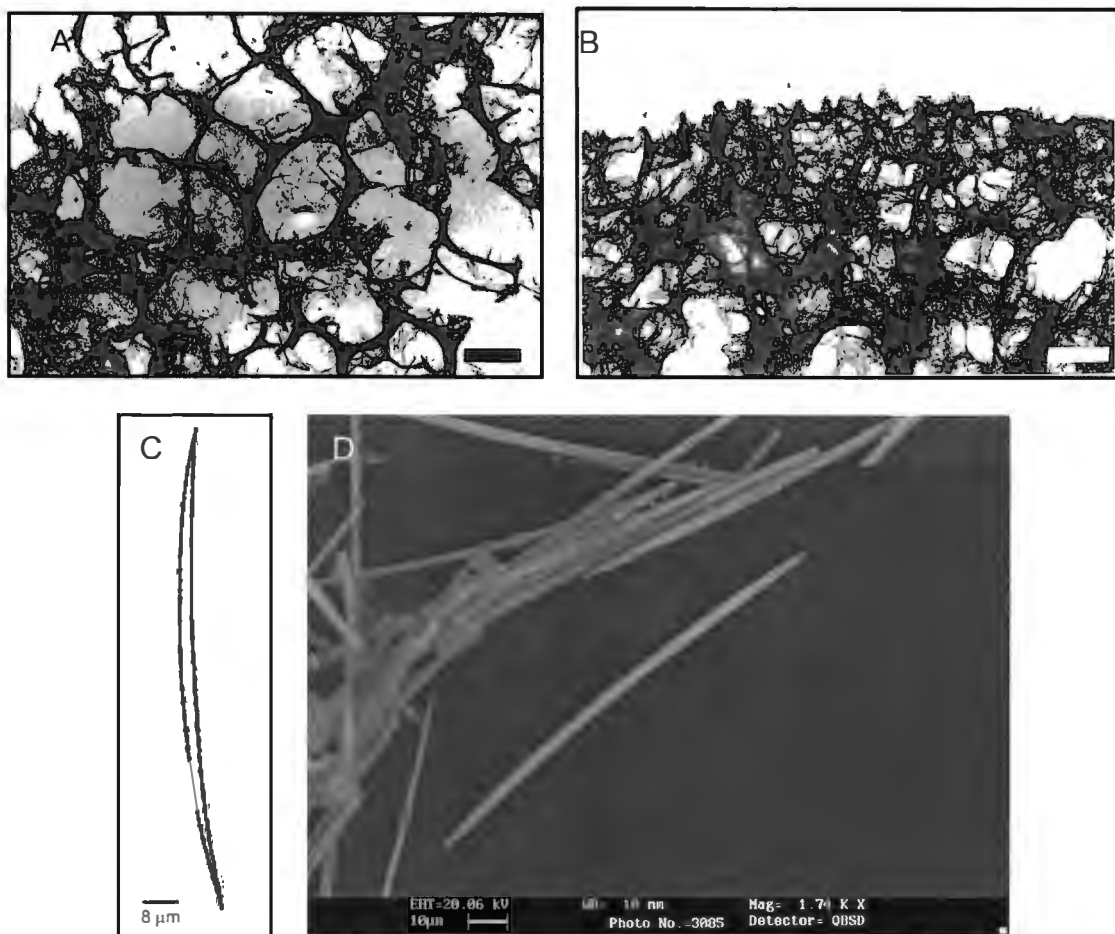


Prancha 4: Indivíduos de *Amphimedon compressa* “in situ”. A: Cartagena (Colômbia; ZEA, 1987, pl. 14, fig. 5). B: San Andrés (Colômbia). Foto. G. Lôbo-Hajdu.



Prancha 5: Diferentes morfotipos de *Amphimedon* aff. *compressa* “in situ”. A: Marechal Deodoro (AL). B-D: Atol das Rocas (RN).

Ecologia: Espécie característica de recifes de coral (VAN SOEST, 1980; MORAES, VILANOVA & MURICY, 2003). Espécimes ramosos são mais abundantes nos taludes recifais, enquanto formas incrustantes ou massivas ocorrem geralmente entre corais, em águas rasas (ZEA, 1987).



Prancha 6: *Amphimedon compressa* Duchassaing & Michelotti, 1864: A. Arquitetura esquelética de MNRJ 4133: Corte tangencial à superfície mostrando malhas de formato irregular. Escala= 200 μ m. B. Arquitetura esquelética de MNRJ 4133: Corte perpendicular à superfície mostrando fibras primárias irregulares protraindo discretamente na superfície, e fibras secundárias interconectantes, ambas multiespiculares. Escala= 200 μ m. C. Espícula do tipo óxea de MNRJ 1119, D. Espículas do tipo óxea, delgadas e discretamente curvas de MNRJ 2155.

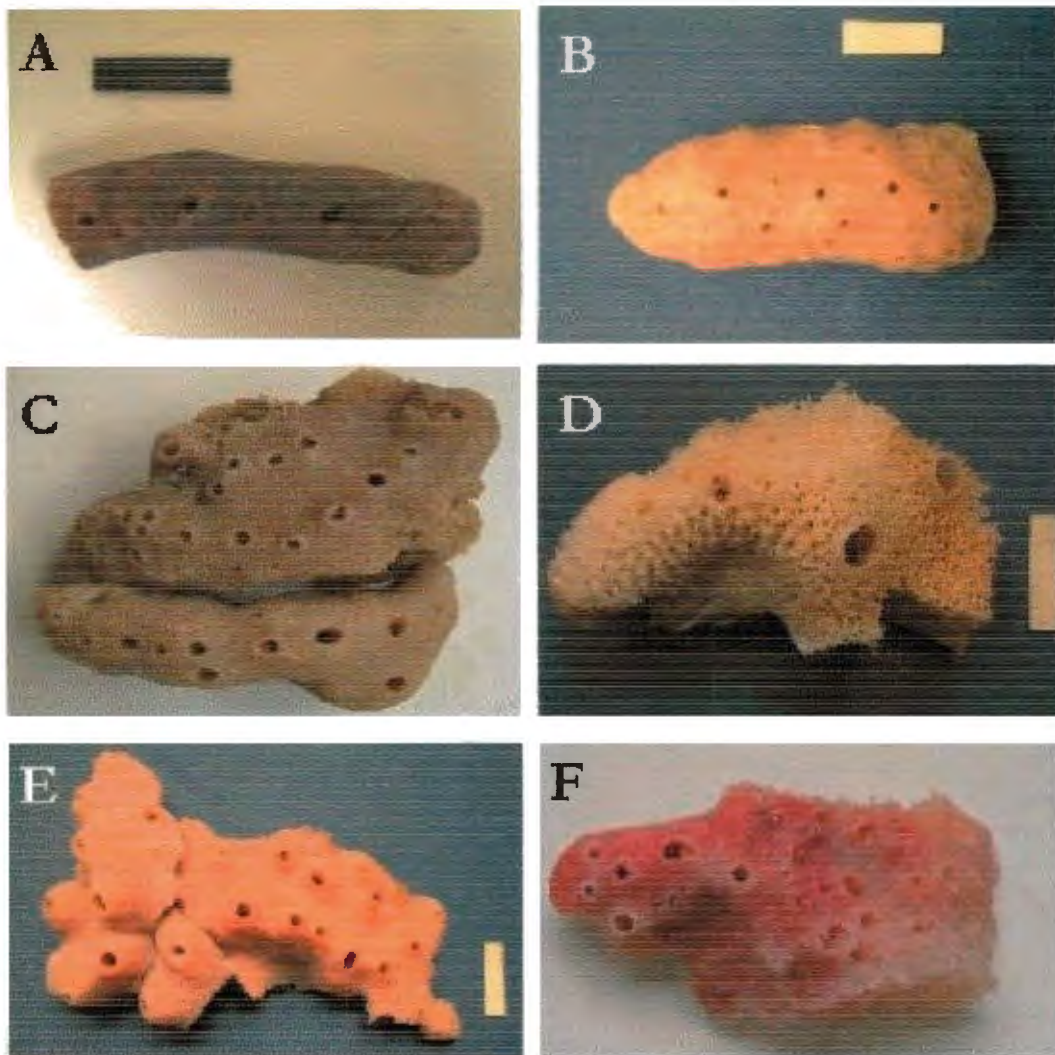
Discussão: A distribuição geográfica da espécie é ampliada neste estudo com o registro de espécimes da Ilha do Bonfim, Angra dos Reis, RJ, costa sudeste do Brasil e da confirmação do status específico de amostras do sublitoral (1-11m) de Atol das Rocas, nordeste do Brasil, anteriormente designadas como *Amphimedon* aff. *compressa*.(MORAES, VILANOVA & MURICY, 2003).

Tabela 4: Mensurações micrométricas de *Amphimedon* aff. *compressa* Duchassaing & Michelotti, 1864. Medidas (mínima-média-máxima) são dadas em micrômetros (μm). Comprimento/espessura. N = 30.

Nº de registro	Mensurações óxeas	Mensurações estilos
MNRJ 2140	112,8- <u>123,1</u> - 134,4/ 2,4- <u>3,2</u> - 4,3	Não visualizado
MNRJ 2155	165,6- <u>177,8</u> -192,0 / 4,8- <u>8,1</u> -12,0	Não visualizado
MNRJ 2155*	124,8- <u>138,2</u> -146,4 / 2,4- <u>3,3</u> -4,3	Não visualizado
MNRJ 2160	62,4- <u>101,4</u> - 120,0 / 1,2- <u>2,2</u> - 3,6	72,0/1,2 (N =1)
MNRJ 2167	108,0- <u>124,6</u> - 139,2/ 1,2- <u>2,3</u> - 3,6	Não visualizado
MNRJ 4707	144,0- <u>152,5</u> - 160,8/ 7,2- <u>11,2</u> - 12,5	144,0- <u>153,3</u> -168,0 / <u>9,6</u> -11,5-12,0 (N =8)
MNRJ 4709	158,4- <u>176,4</u> - 192,0 / 7,2- <u>11,1</u> - 12,2	163,2/ 10,8 (N =1)
MNRJ 6260	76,8- <u>118,8</u> - 132,0/ 2,4- <u>4,1</u> - 5,3	Não visualizado
MNRJ 6261	108,0- <u>124,3</u> - 139,2/ 2,4- <u>4,1</u> - 5,3	Não visualizado
MNRJ 6262	112,8- <u>123,1</u> - 134,4/ 2,4- <u>3,2</u> - 4,3	Não visualizado
MNRJ 6263	96,0- <u>119,4</u> - 144,0/ 1,2- <u>2,5</u> - 3,1	Não visualizado
MNRJ 7244	132,0- <u>154,7</u> - 172,8/ 2,4- <u>7,6</u> - 12,0	91,2- <u>114,2</u> - 132,0/ 4,8- <u>5,5</u> -7,2 (N =5)
MORAES (2000) como <i>Amphimedon</i> aff. <i>compressa</i>	76,0- <u>115,0</u> -144,0 / 1,5- <u>2,4</u> -4,0	Localidade: Atol das Rocas, Brasil; profundidade: 1 - 10 metros

Tabela 5: Mensurações micrométricas das espículas, distribuição geográfica e batimétrica de *A. compressa* Duchassaing & Michelotti, 1864.

Citação bibliográfica	Mensurações óxeas (µm)		Localidade	Profundidade (m)
	Comprimento	Espessura		
DUCHASSAING & MICHELOTTI (1864)	S/reg.	S/reg.	Bahamas	S/reg.
CARTER (1882) como <i>Chalina rubens</i>	230,0	3,0	Bahamas, Flórida	S/reg.
WILSON (1902)	160,0	4,0	Porto Rico	S/reg.
DE LAUBENFELS (1936) como <i>Haliclona rubens</i>	100,0 – 117,0	3,0 – 4,0	Dry Tortugas, Flórida	3 - 17
DE LAUBENFELS (1949) como <i>Haliclona rubens</i>	110,0	4,0	Bahamas, Flórida	1
HARTMAN (1955) como <i>Haliclona rubens</i>	109,0- <u>135,0</u> -155,0	1,5- <u>5,5</u> -8,0	Golfo de Campeche, México	1
LITTLE (1963) como <i>Haliclona viridis</i>	115,0- <u>136,0</u> -157,0	1,8- <u>4,1</u> -7,3	Flórida	0 - 1
WIEDENMAYER (1977) como <i>Haliclona (Amphimedon) compressa</i>	103,0 – 145,0	2,0 – 5,0	Bahamas, Flórida	S/reg.
VAN SOEST (1980)	116,0- <u>146,5</u> -174,0	2,5- <u>4,8</u> -7,5	St. Maarten; Anguilla Porto Rico; Curaçao	2 - 35
PULITZER-FINALI (1986)	140,0 – 167,0	4,5 – 8,0	S/reg.	S/reg.
ZEA (1987)	123,0- <u>176,0</u> -209,0	1,4- <u>8,8</u> -14,2	Colômbia (Caribe):	0,5 - 25
LEHNERT (1993)	95,0 – 145,0	4,0 – 7,0	Cozumel, México	S/reg.
MNRJ 1119	124,8- <u>144,6</u> -158,4	6,0- <u>8,6</u> -12,0	Carie Bow Cay, Belize	
UFRJPOR 4133	115,2- <u>153,3</u> -170,4	3,6- <u>6,9</u> -9,6	Carie Bow Cay, Belize	
MNRJ 7979	108,0- <u>127,4</u> -144,0	1,2- <u>3,4</u> -4,8	Cueva de los peces, Cuba	
MNRJ 7980	103,2- <u>128,7</u> -144,1	1,2- <u>2,8</u> -4,8	Cueva de los peces, Cuba	



Prancha 7: **A-B**, *Amphimedon compressa* fixadas, coleção do Museu Nacional. **A**, MNRJ 1119. **B**, UFRJPOR 4133. **C-F**, *Amphimedon* aff. *compressa* fixadas, coleção do Museu Nacional. **C**, MNRJ 4709. **D**, MNRJ 2155. **E**, MNRJ 2167. **F**, MNRJ 2140. Diferentes tonalidades de espécimes fixados podem ser oriundas de pigmentação exógena, decorrente de utilização de um recipiente para mais de uma espécie (E. HAJDU, com. pess.).

Resultados e discussões moleculares

Extração e quantificação do DNA

A extração do DNA genômico foi feita a partir do protocolo descrito por LÔBO-HAJDU et al. (1999).

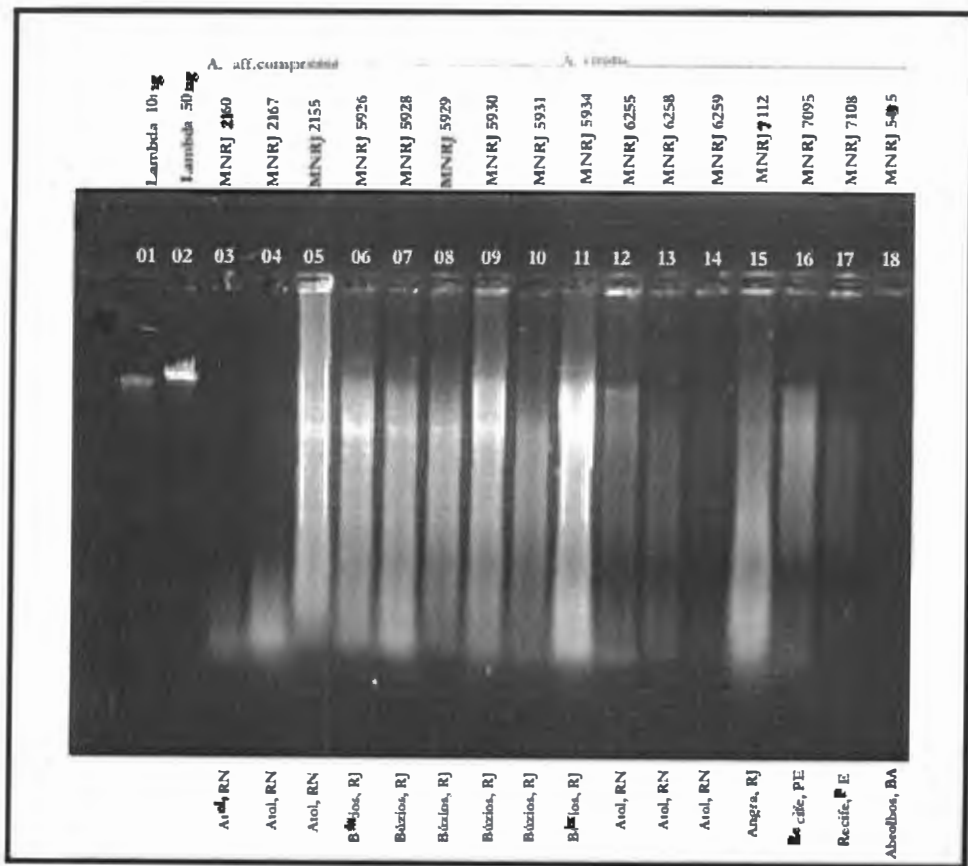


Figura 11: Gel de agarose a 0,8% para quantificação do DNA genômico extraído. Raias 01 e 02 = padrão de concentração de DNA de fago lambda 10ng e 50ng; raia 03 = *A. aff. compressa* (MNRJ 2160); raia 04 = *A. aff. compressa* (MNRJ 2167); raia 05 = *A. aff. compressa* (MNRJ 2155); raia 06 = *A. viridis* (MNRJ 5926); raia 07 = *A. viridis* (MNRJ 5928); raia 08 = *A. viridis* (MNRJ 5929); raia 09 = *A. viridis* (MNRJ 5930); raia 10 = *A. viridis* (MNRJ 5931); raia 11 = *A. viridis* (MNRJ 5934); raia 12 = *A. viridis* (MNRJ 6255); raia 13 = *A. viridis* (MNRJ 6258); raia 14 = *A. viridis* (MNRJ 6259); raia 15 = *A. viridis* (MNRJ 7112); raia 16 = *A. viridis* (MNRJ 7095); raia 17 = *A. viridis* (MNRJ 7108); raia 18 = *A. viridis* (MNRJ 5495).

Todas as amostras analisadas resultaram em DNA extraído com qualidade suficiente para amplificação por PCR. A Figura 11 ilustra alguns exemplos de resultado de extração, comparando aquela obtida a partir de amostras frescas (Fig. 11, raias 05-12), com um rendimento e qualidade superior, e a derivada de amostras de coleção (Fig. 11, raias 03, 04 e 13-18).

Comparação entre amostras preservadas em diversos fixadores

Os métodos de conservação do DNA genômico de esponjas precisam ser otimizados para um melhor aproveitamento das amostras de difícil coleta, como exemplares que ocorrem em regiões remotas ou de acesso restrito.

Visando analisar a eficiência de diferentes métodos de preservação do DNA de *Amphimedon*, tratamos fragmentos de *A. viridis* recém coletados em Búzios (RJ) com seis diferentes métodos de conservação: a seco, em álcool (etanol) 70%, em álcool comercial (96%), em gelo seco, em tampão de lise e em sílica gel.

Depois de sete, quinze, trinta e sessenta dias nos diferentes métodos de conservação, o DNA das amostras foi extraído com fenol-clorofórmio e precipitado com etanol. Após este procedimento, foi realizada eletroforese em gel de agarose a 0,8% para a análise qualitativa e quantitativa do DNA extraído (Figuras 12 e 13).

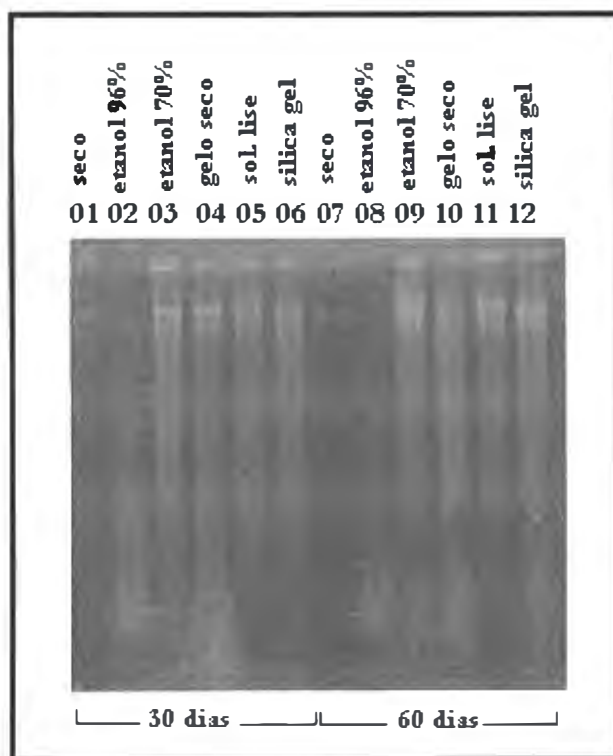


Figura 12: Gel de agarose a 0,8% apresentando o DNA genômico total extraído de amostras preservadas em diferentes fixadores por 30 e 60 dias. Raias 01 e 07 = seco; raias 02 e 08 = etanol 96%; raias 03 e 09 = etanol 70%; raias 04 e 10 = gelo seco; raias 05 e 11 = solução de lise; raias 06 e 12 = sílica gel. Raias 01-06 = 30 dias e raias 07-12 = 60 dias no fixador.

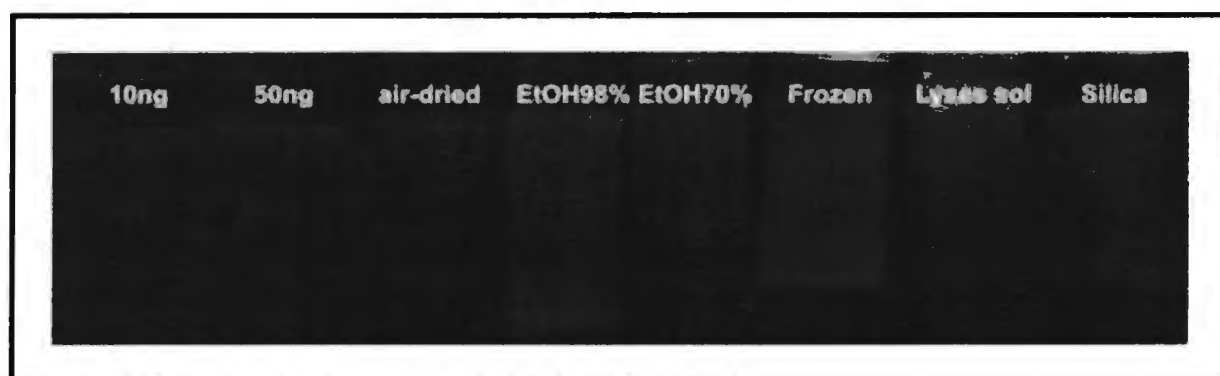


Figura 13: Gel de agarose a 0,8% para quantificação do DNA genômico extraído de amostras preservadas em diferentes fixadores por 7 dias.

Surpreendentemente, o melhor resultado para *Amphimedon viridis* foi a preservação a seco, seguida, em ordem de qualidade decrescente, por solução de lise, gelo seco, etanol 96%, sílica gel e etanol 70%.

Este resultado é distinto do obtido para outras esponjas, *Paraleucilla* Dendy, 1892 e *Hymeniacidon* Bowerbank, 1859, cuja ordem de qualidade decrescente foi: solução de lise, gelo seco, sílica gel, etanol 96%, etanol 70% e amostra seca. Pode-se afirmar que para estes gêneros, os métodos de conservação por congelamento em gelo seco e de preservação em tampão de lise, funcionaram de forma similar, tanto qualitativa quanto quantitativamente. Contudo, a relação custo-benefício de ambos não é vantajosa, especialmente quando levamos em consideração a quantidade de fixadores e a infraestrutura necessária para preservar amostras em uma ida a campo com objetivo de levantamento (quantidade grande de amostras) e por um período longo de tempo.

A discrepância dos resultados entre *Amphimedon* e os outros gêneros pode ser explicada pela consistência do esqueleto das *Amphimedon*, que perderiam água com mais facilidade, evitando, assim, a hidrólise do DNA (G. LÔBO-HAJDU, com. pess.).

A preservação feita em sílica e em etanol 96% também mostrou ser eficiente, com uma relação custo-benefício mais vantajosa. Sugerimos desta forma a utilização de etanol 96% como o fixador mais apropriado para campanhas faunísticas de grande porte, com a ressalva de que *Amphimedon*, ao menos como indicado por *A. viridis*, pode ser conservado também a seco.

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Após a amplificação das amostras por PCR, os produtos foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 2%. A Figura 14 mostra um exemplo da amplificação da região de ITS-2 de *A. viridis* de várias procedências.

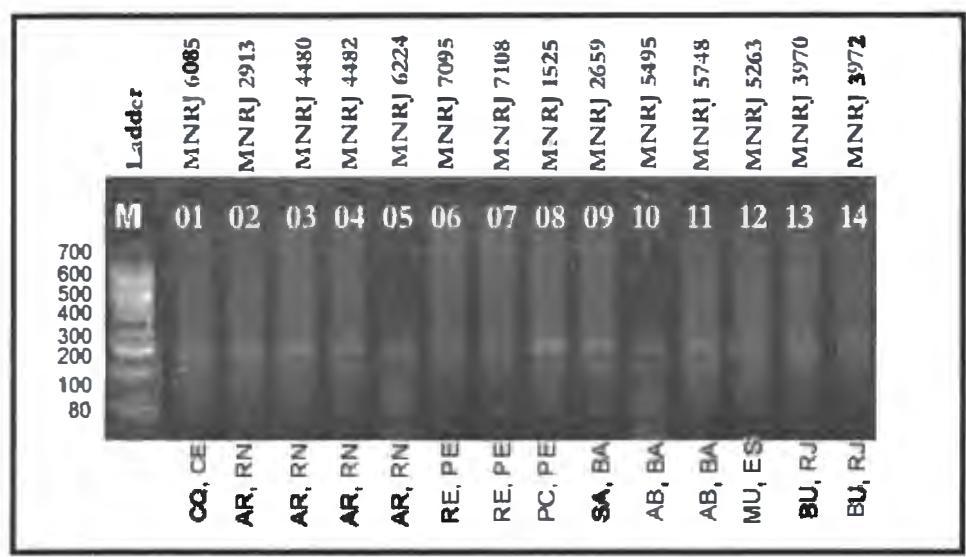


Figura 14: Gel de agarose 2% em TBE 0,5 X apresentando os padrões dos fragmentos de ITS2. Onde: marcador de 100kb Ladder (1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80 bp), raia 1= MNRJ 6085, raia 2= MNRJ 2913, raia 3= MNRJ 4480, raia 4= MNRJ 4482, raia 5= MNRJ 6224, raia 6= MNRJ 7095, raia 7= MNRJ 7108, raia 8= MNRJ 1525, raia 9= MNRJ 2659, raia 10= MNRJ 5495, raia 11= MNRJ 5748, raia 12= MNRJ 5263, raia 13= MNRJ 3970 e raia 14= MNRJ 3972. Gel visualizado após incubação com 6 µg/mL de brometo-de-etídeo. Pode-se observar que há uma variação na intensidade das bandas, isso se deve à quantidade de material amplificado no PCR. CQ – Canoa Quebrada. AR – Atol das Rocas. RE – Recife. PC – Ponta dos Carneiros. AS – Salvador. AB – Abrolhos. UM – Mucugê. BU – Búzios. Para dados complementares de coleta, referir à Tabela 1.

Nota-se uma pequena diferença de tamanho (com oscilação de cerca de 20 pb em torno de 200 pb) entre os fragmentos de ITS-2 amplificados dos indivíduos da espécie *Amphimedon viridis*.

A Figura 15 apresenta a variação no tamanho dos fragmentos de ITS1 e de ITS2 em amostras de *Amphimedon aff. compressa*.

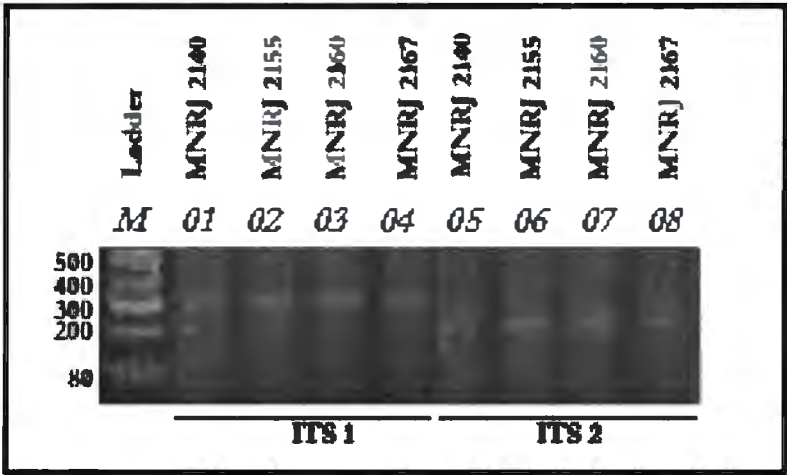


Figura 15: Gel de agarose 2% (27102003) em TBE 0,5 X apresentando os padrões dos fragmentos de ITS1 e ITS2 de *Amphimedon aff. compressa*. Onde: marcador 100kb Ladder (1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80 bp), raia 01-04= ITS1 e raia 05-08= ITS2. Para dados de coleta, referir à Tabela 1.

Observou-se diferença de tamanho em pares de bases entre as regiões de ITS-1 e ITS-2 (Figura 15), que corroborou a constatação prévia de que a região de ITS-1 é maior que a de ITS-2, como verificado por GUIMARÃES (2002) em *Hymeniacidon heliophila* (Parker, 1910).

Podemos notar também a diferença no tamanho dos fragmentos de ITS-1, variando em torno de 300 pares de base, e de ITS-2, um pouco acima de 200 pares de bases.

O tamanho dos fragmentos de ITS em *Amphimedon* são um pouco maiores do que em *Hymeniacidon* (GUIMARÃES, 2002). Este tamanho está na faixa ideal, entre 200 e 400 pares de bases, para a separação pela técnica do SSCP (ORITA *et al.*, 1989; SUNNUCKS *et al.*, 2000).

Caracterização molecular de espécies do gênero *Amphimedon* por SSCP

Apesar dos diferentes morfotipos encontrados para a espécie *Amphimedon viridis* na costa brasileira, o que é um fator complicador para a sua classificação, esta espécie apresenta um padrão molecular homogêneo para o fragmento de ITS1 entre amostras retiradas de localidades diversas. As Figuras 16 a 19 apresentam amostras classificadas como *A. viridis*.

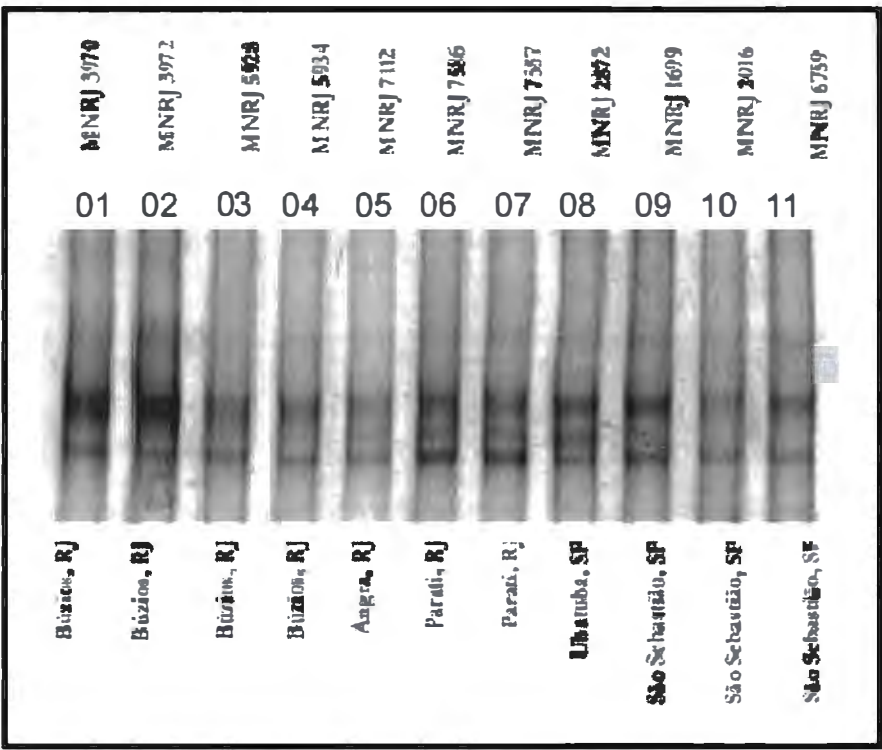


Figura 16: Gel #1 de SSCP-PAGE na concentração de 8%, apresentando pouca variação da região de ITS1 em *Amphimedon viridis*. Onde, raia 1= MNRJ 3970, raia 2= MNRJ 3972, raia 3= MNRJ 5928, raia 4= MNRJ 5934, raia 5= MNRJ 7112, raia 6= MNRJ 7586, raia 7=MNRJ 7587, raia 8= MNRJ 2832, raia 9= MNRJ 1699, raia 10= MNRJ 2016 e raia 11= MNRJ 6759. Gel visualizado após tratamento pelo método de coloração por prata (BASSAM *et al.*, 1991). Para dados de coleta, referir à Tabela 1.

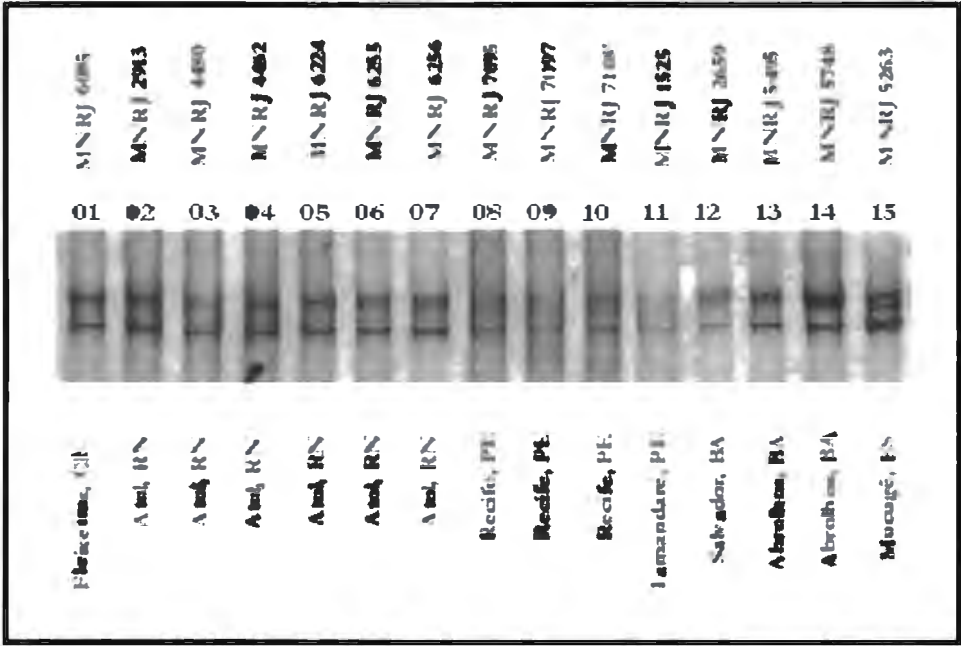


Figura 17: Gel #2 de SSCP-PAGE na concentração de 8%, apresentando pouca variação da região de ITS1 em *Amphimedon viridis*. Onde, raia 1= MNRJ 6085, raia 2= MNRJ 2913, raia 3= MNRJ 4480, raia 4= MNRJ 4482, raia 5= MNRJ 6224, raia 6= MNRJ 6255, raia 7= MNRJ 6256, raia 8= 7095, raia 9= MNRJ 7097, raia 10= MNRJ 7108, raia 11=MNRJ 1525, raia 12= MNRJ 2659, raia 13= MNRJ 5495; raia 14= MNRJ 5748; raia 15= MNRJ 5263. Para dados de coleta, referir à Tabela 1.

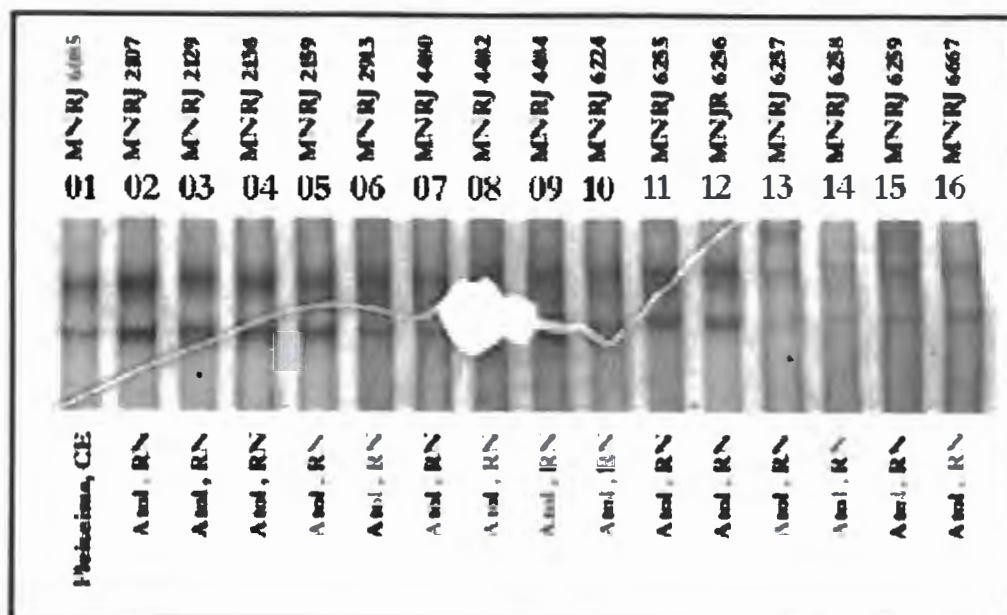


Figura 18: Gel #3 de SSCP-PAGE na concentração de 8%, apresentando pouca variação da região de ITS1 em *Amphimedon viridis*. Onde, raia 1= MNRJ 6085, raia 2= MNRJ 2107, raia 3= MNRJ 2129, raia 4= MNRJ 2136, raia 5= MNRJ 2159, raia 6= MNRJ 2913, raia 7= MNRJ 4480, raia 8= 4482, raia 9= MNRJ 4484, raia 10= MNRJ 6224, raia 11=MNRJ 6255, raia 12= MNRJ 6256, raia 13= MNRJ 6257, raia 14= MNRJ 6258, raia 15= MNRJ 6259 e raia 16= MNRJ 6667. Para dados de coleta, referir à Tabela 1.

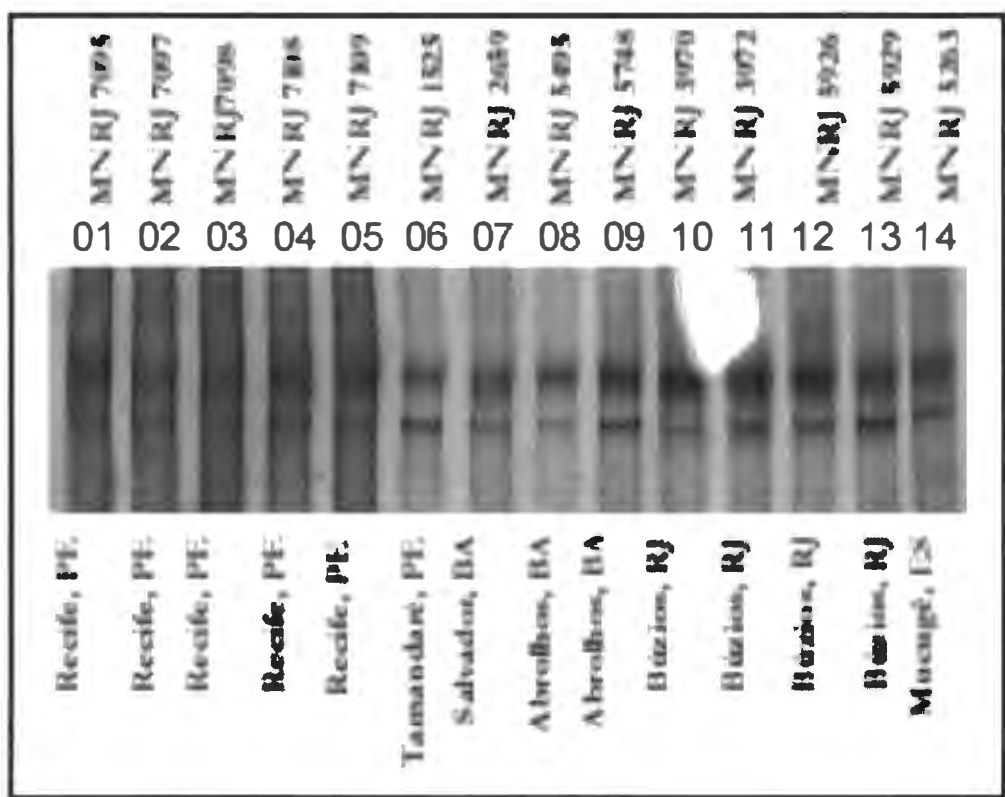


Figura 19: Gel #4 de SSCP-PAGE na concentração de 8%, apresentando pouca variação da região de ITS1 em *Amphimedon viridis*. Onde, raia 1= MNRJ 7095, raia 2= MNRJ 7097, raia 3= MNRJ 7098, raia 4= MNRJ 7108, raia 5= MNRJ 7109, raia 6= MNRJ 1525, raia 7= 2659, raia 8= MNRJ 5495, raia 9= MNRJ 5748, raia 10= MNRJ 3970, raia 11= MNRJ 3972, raia 12= MNRJ 5926, raia 13= MNRJ 5929 e raia 14= MNRJ 5263. Para dados de coleta, referir à Tabela 1.

Observa-se claramente a homogeneidade (baixa variabilidade) da região do ITS1 para indivíduos da espécie *A. viridis*. Este dado corrobora a hipótese de co-especificidade dos espécimes de *A. viridis* coletados em diversas localidades do litoral brasileiro.

O fato de um invertebrado marinho apresentar baixa variabilidade genética pode ser considerado uma surpresa (SOLÉ-CAVA & THORPE, 1991 e 1994; LÔBO-HAJDU et al., 1999). Contudo, dados recentes sugerem que esponjas e corais apresentam baixíssima diversidade genética em regiões normalmente

polimórficas em organismos mais complexos, como mamíferos, por exemplo (A. Solé-Cava, com. pess.). Assim, microsátélites, variabilidade no DNA mitocôndrial e em regiões intrônicas de genes nucleares são raras em Porifera (WÖRHEIDE, 1998; ERPENBECK et al., 2002; WÖRHEIDE et al., 2002, 2003).

A Figura 20 apresenta a variabilidade do fragmento de ITS1 em amostras de *A. aff. compressa* brasileiras comparadas a *A. compressa* do Caribe. Se por um lado a variabilidade observada é tamanha, de tal forma que nenhum dos quatro espécimes brasileiros testados apresenta variante de SSCP para ITS1 similar a de qualquer espécime do Caribe, é importante notar também que existe variabilidade em ambos casos, Caribe e Brasil. Estes resultados não permitem assim rejeitar a hipótese de conspecificidade entre os espécimes brasileiros identificados como *A. aff. compressa* e *A. compressa* do Caribe

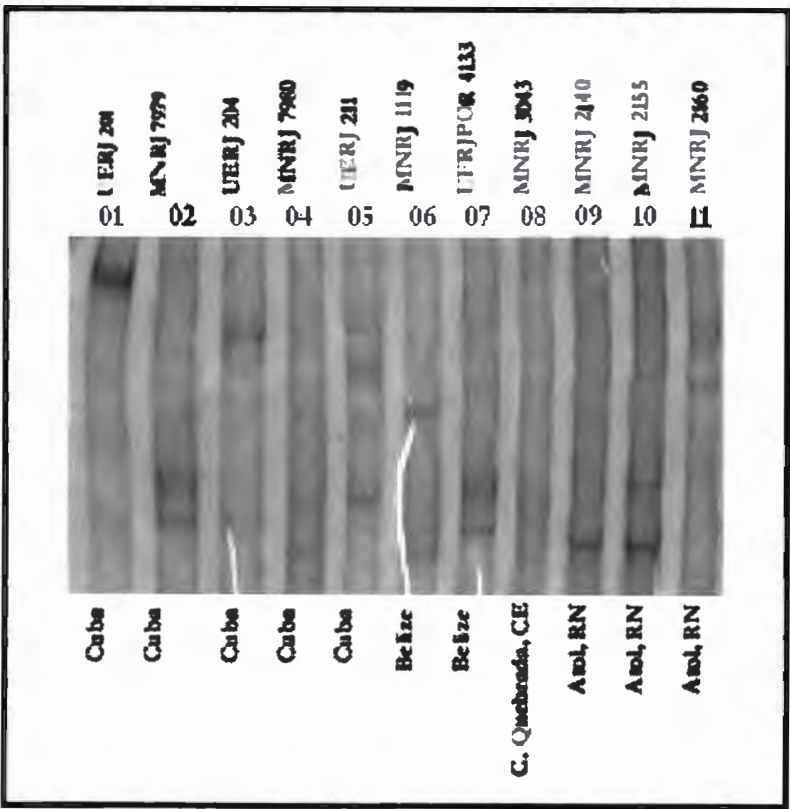


Figura 20: Gel de SSCP-PAGE na concentração de 8%, apresentando variação da região de ITS1 em *Amphimedon aff. compressa*. Onde, raia 1= UERJ 201, raia 2= MNRJ 7979, raia 3= UERJ 204, raia 4= MNRJ 7980, raia 5= UERJ 211, raia 6= MNRJ 1119, raia 7= MNRJ 4133, raia 8= 3043, raia 9= MNRJ 2140, raia 10= MNRJ 2155 e raia 11=MNRJ 2160. Para dados de coleta, referir à Tabela 1.

LAMARÃO (2001), GUIMARÃES (2002) e SALGADO (2003) observaram maior variabilidade na região de ITS2 do que na de ITS1 em esponjas, o mesmo padrão tendo sido observado também em outros organismos (DEPRÉS et al., 1995, em platelmintos; VIDIGAL et al., 2000, 2002, em moluscos).

Surpreendentemente, em *A. aff. compressa* e *A. compressa* observou-se baixa variabilidade na região do ITS2 (Figura 21).

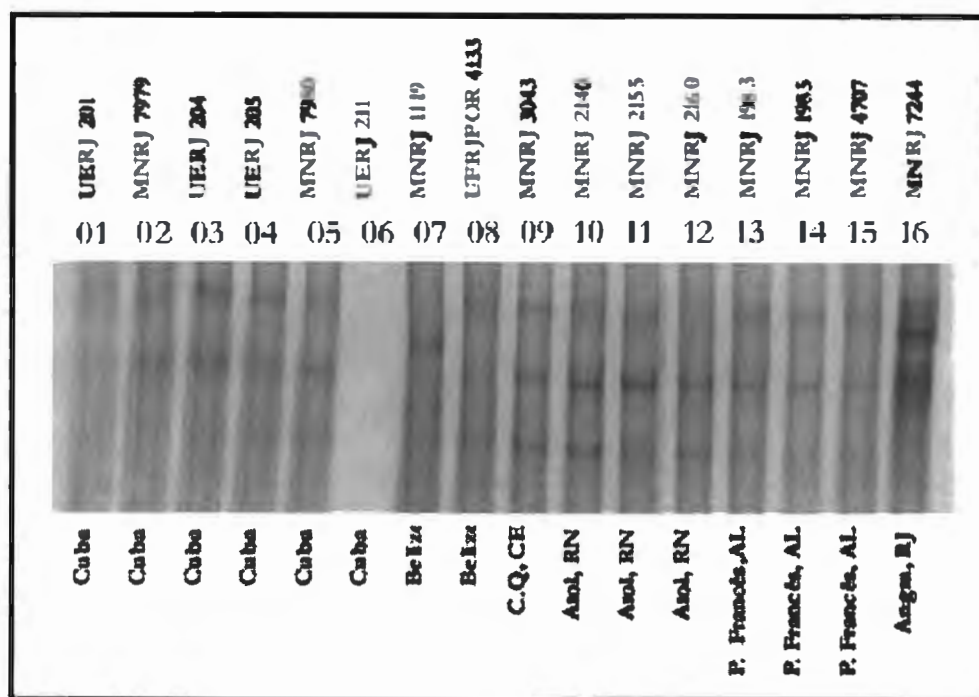


Figura 21: Gel de SSCP-PAGE na concentração de 8%, apresentando pouca variação da região de ITS2 em *Amphimedon compressa* e *A. aff. compressa*. Onde, raia 1= MNRJ 201, raia 2= MNRJ 202, raia 3= MNRJ 204, raia 4= MNRJ 205, raia 5= MNRJ 206, raia 6= MNRJ 211, raia 7= MNRJ 1119, raia 8= 4133, raia 9= MNRJ 3043, raia 10= MNRJ 2140, raia 11=MNRJ 2155, raia 12= MNRJ 2160, raia 13= MNRJ 1989, raia 14= MNRJ 1985, raia 15= MNRJ 4707 e raia 16= MNRJ 7244. Para dados de coleta, referir à Tabela 1.

Outra possibilidade que resolvemos verificar é a de que ao menos em parte, *Amphimedon aff. compressa* e *A. viridis* brasileiras fossem conspecíficas. Esta opção foi motivada pela constatação de que, especialmente na Praia do Francês (Marechal Deodoro, AL), a observação de ambas, *in situ*, e lado a lado, não pôde detectar qualquer diferença além da coloração. Fotografias submarinas de ambas foram enviadas aos Drs. R.W.M. van Soest (Amsterdam, Holanda) e S. Zea (Santa Marta, Colômbia) que manifestaram a opinião de que ambas fossem morfotipos de *A. viridis*. A figura 22 ilustra o resultado desta comparação, valendo-se entretanto de duas *A. aff. compressa* do Atol das Rocas (RN).

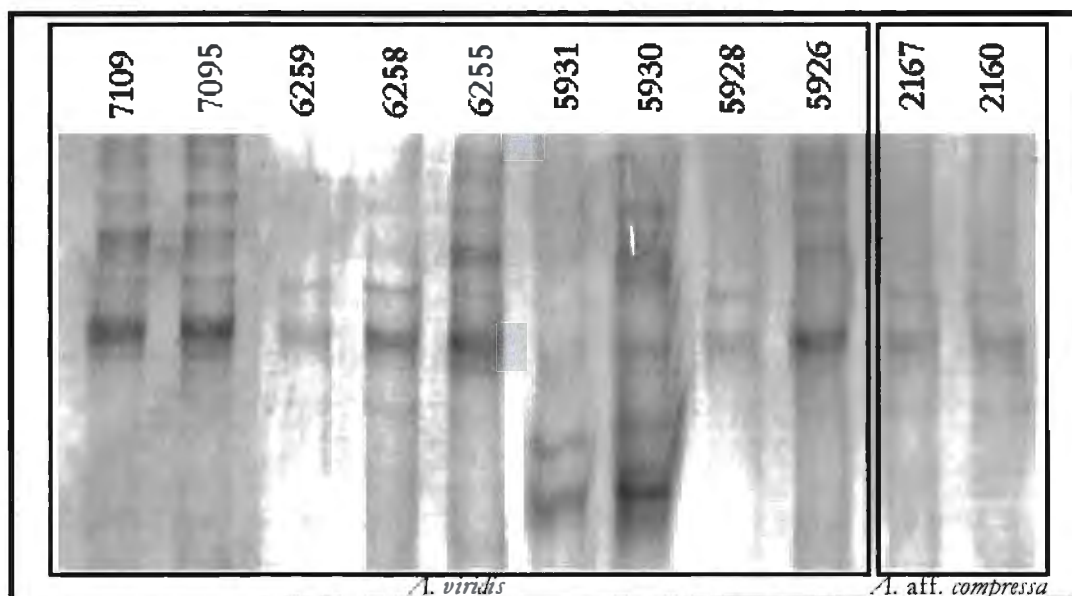


Figura 22: Gel de SSCP-PAGE na concentração de 8%, apresentando pouca variação da região de ITS1 em *Amphimedon viridis* [raia 1= MNRJ 7109 (PE), raia 2 = MNRJ 7095 (PE), raia 3 = MNRJ 6259 (RN), raia 4 = MNRJ 6258 (RN), raia 5 = MNRJ 6255 (RN), raia 6 = MNRJ 5931 (RJ), raia 7 = MNRJ 5928 (RJ), raia 8 = MNRJ 5926 (RJ)] e *A. aff. compressa*. [raia 9 = MNRJ 2167 (RN), raia 10 = β MNRJ 2160 (RN)]. Para dados de coleta, referir à Tabela 1.

Os resultados obtidos (Figura 22) indicam que, ao menos alguns indivíduos de *Amphimedon aff. compressa* e *A. viridis* brasileiras são conspecíficas.

Os dados apresentados para a região de ITS1 neste trabalho, apresentam baixa variabilidade entre os indivíduos de *A. viridis*, compreendendo inclusive morfotipos julgados distintos e identificados como *A. aff. compressa*. Já os resultados obtidos para *A. aff. compressa* divergem daqueles obtidos para outros grupos de esponjas estudados no que diz respeito a uma maior variabilidade genética da região de ITS-2 em relação a de ITS-1 (LAMARÃO, 2002; GUIMARÃES, 2002; SALGADO,

2003; LÔBO-HAJDU, 2001), o que, no entanto, já foi observado em outros grupos taxonômicos (COLEMAN & MAI, 1987).

Comparação entre dados morfológicos e moleculares

Dentre os espécimes de *A. viridis* estudados morfolologicamente, MNRJ 2136 (Atol das Rocas) e MNRJ 5495 (Abrolhos) destacam-se pelas dimensões consideravelmente mais delgadas e curtas de suas óxeas quando comparadas às das demais *A. viridis* estudadas (Tabela 2). Apenas WIEDENMAYER (1977) obteve valores micrométricos similares para espécimes do Caribe. A Figura 18 ilustra a grande similaridade do padrão de SSCP para ITS1 de MNRJ 2136, quando comparado ao padrão, por exemplo, do espécime MNRJ 6085 (Flexeiras), no entanto possuidor de megascleras até 400% mais robustas e 40% mais longas que as de MNRJ 2136. O mesmo se observa para MNRJ 5495 na Figura 19, onde exhibe padrão de SSCP para ITS1 absolutamente congruente ao de diversos outros espécimes oriundos do litoral sudeste e nordeste brasileiros. Dentre estes, MNRJ 7095 (Recife), possui megascleras 430% mais robustas e 210% mais longas que as de MNRJ 5495.

Desta forma, demonstra-se aqui que a observação de considerável variabilidade morfológica em caracteres tradicionalmente utilizados no

reconhecimento de espécies de Demospongiae não é garantia de observação de variabilidade quanto aos variantes de SSCP para ITS1.

A Tabela 4 mostra também considerável variabilidade quanto à espessura das megascleras de *A. aff. compressa*, 3,6µm de espessura máxima em MNRJ 2160 (Atol das Rocas) e 12,5µm em MNRJ 4707 (Praia do Francês). Os comprimentos das óxeas destes espécimes são entretanto menos variáveis, 120µm e 160µm, respectivamente. Corroborando as observações para *A. viridis* e ITS1, a Figura 21 mostra que padrões de SSCP do ITS2 de MNRJ 2160 e 4707 são praticamente indistinguíveis.

Com os resultados acima, não chega a surpreender a observação de altas similaridades nos padrões de SSCP de ITS1 entre MNRJ 2160 e 2167, previamente identificados como *A. aff. compressa*, e aqueles obtidos para vários indivíduos de *A. viridis* do Atol das Rocas, Recife e Búzios, uma vez que os valores micrométricos listados nas tabelas 2 e 4 são absolutamente comparáveis.

A ocorrência de raros estilos dentre alguns dos espécimes estudados morfológicamente é vista como possivelmente oriunda de malformações, não aparentando relacionar-se a qualquer particularidade adicional, genética ou morfológica.

ZEA (1987) postulou que a variabilidade na espessura e comprimento das megascleras poderia estar relacionada à distinta disponibilidade de sílica dissolvida na água, ao comparar-se localidades costeiras e oceânicas. Este autor observou que

37 em 70 espécies apresentavam espículas silicosas mais longas e robustas em localidades no litoral caribenho colombiano (p.ex. Santa Marta e Cartagena), quando comparadas às suas populações oceânicas (p.ex. Providência e San Andrés). Os resultados obtidos aqui são inconclusivos quanto a esta hipótese, visto que espécimes de *A. viridis* do Atol das Rocas possuem espessura máxima de suas óxeas variando de 2,9 a 9,6µm, enquanto espécimes costeiros (ou de ilhas próximas ao continente) oscilam entre 2,9 e 13,2µm (Tabela 2). Para *A. aff. compressa* (Tabela 4) observam-se valores entre 3,1 e 12µm no Atol das Rocas, e entre 12 e 12,5µm em localidades litorâneas. Ou seja, as duas espécies parecem responder diferentemente ao fator isolamento oceânico.

Se como sugerido pela Figura 22, todas as amostras brasileiras estudadas nesta dissertação pertencerem a uma espécie apenas (*A. viridis*), a variabilidade observada na robustez e comprimento das espículas passam a ser praticamente idênticas no Atol das Rocas e nas localidades litorâneas.

Conclusões

Concluimos que:

- (1) as *Amphimedon viridis* do Nordeste e as *Amphimedon viridis* do Sudeste são co-específicas, com base na variabilidade dos padrões de SSCP para o ITS1;
- (2) ao menos em parte (espécimes MNRJ 2160 e 2167), *Amphimedon* aff. *compressa* é co-específica a *Amphimedon viridis*, com base na variabilidade dos padrões de SSCP para o ITS1;
- (3) a variabilidade da região gênica dos ITS para *Amphimedon* não nos permitiu distinguir as espécies *Amphimedon* aff. *compressa* e *Amphimedon compressa*.

Perspectivas

Análise por SSCP de outras seqüências de DNA, como por exemplo regiões intrônicas de genes nucleares e a região controle do DNA mitocondrial, poderão fornecer mais subsídios para a distinção de espécies de *Amphimedon*.

O seqüenciamento da região dos ITS, incluindo o gene do RNAr 5.8S, também é uma alternativa para aumentar o número de caracteres moleculares úteis para a resolução deste problema.

Referências Bibliográficas

- ALCOLADO P.M. (1984). Utilidad de algunos índices ecologicos estructurares em el estudio de comunidades marinas de Cuba. *Ciencias Biologicas no. 11*: 61-77.
- ALCOLADO P.M. & HERRERA A. (1987). Efectos de la contaminacion sobre las comunidades de esponjas em el litoral de la Habana, Cuba. *Rep. Invest. Inst. Ocean. Acad. Sci. Cuba* **68**: 1-23.
- ALMEIDA A.M.P., BERLINCK R.G.S. & HAJDU E. (1997). Alcalóides alquilpiridínicos de esponjas marinhas. *Química Nova*, **20**(2): 170-185.
- AMORIM D.S. (1997). Elementos básicos de Sistemática Filogenética (2a Edição). *Holos Editora, Sociedade Brasileira de Entomologia, Ribeirão Preto (SP)*, xviii + 276p.
- AMOS B. & HOEZEL R. (1991). Long-term preservation of whale skin for DNA analysis. *Rep Int Whal Comm Special Issue* 13:99-103.

ASENSIO L., GONZÁLEZ I., FERNÁNDEZ A., RODRIGUEZ M.A.,
HERNÁNDEZ P.E., GARCÍA T. & MARTÍN R., (2001). PCR-SSCP: A simple
method for the authentication of grouper (*Epinephelus guaza*), wreck fish
(*Polyprion americanus*), and nile perch (*Lates niloticus*) fillets. *J. Agric. Chem.*,
49:1720-1723.

ARRIGHI F.E., BERGENDAHL J. & MANDEL E.M. (1968). Isolation and
characterization of DNA from fixed cells and tissues. *Experimental Cell Reserach*. **50**:
47-53.

BASSAM B.J., CAETANO-ANOLLES G. & GRESSHOFF P.M. (1991). Fast and
sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. *Anal. Biochem.* **196**(1): 80-83.

BERGQUIST P.R. (1978). *Sponges*. Hutchinson & Co., Londres. 268 pp.

BERGQUIST P.R. (1980). The ordinal and subclass classification of Demospongiae
(Porifera); appraisal of the present arrangement, and proposal of a new order. *N. Z.*
J. Zool. **7**(1): 1-6.

BERLINCK R.G.S., OGAWA C.A., ALMEIDA A.M.P., SANCHEZ M.A.A., COSTA L.V., MALPEZZI E.L.A., FREITAS J.C. & HAJDU E. (1996). Chemical and pharmacological characterization of halitoxin from *Amphimedon viridis* (Porifera) from the Southeastern Brazilian Coast. *Comp. Biochem. Physiol*, **115C** (2): 155-163.

BROWN T.A. (2003). Clonagem gênica e análise de DNA Uma introdução. 4º edição. Editora ARTMED.

BRUSCA R.G. & BRUSCA G.J. (1990, eds.). Porífera, pp.181-210. In: Invertebrates. *Sinauer Associates*, Sunderland, MA.

BURTON, M. (1937). The littoral fauna of Krusadai Island in the Gulf of Manaar. *Bull. Madras Govt. Mus. (n.s.), Nat. Hist. sect. 1* (2), p. 1-58, 9 pls.

CARTER, H.J. (1882). Some sponges from the West Indies and Acapulco in the Liverpool Free Museum, described with general and classificatory remarks. *Ann. Mag. Nat. Hist.* **9** (5): 266-301, 346-368, pls. 11-12.

- CARVALHO M.S. & HAJDU, E. (2001). Comments on brazilian Halichondria Fleming (Halichondriidae, Halichondrida, Demospongiae), with the description of four new species from the São Sebastião Channel and its environs (Tropical Southwestern Atlantic). *Revista Brasileira de Zoologia, Curitiba*, v. 18, n. Supl. 1, p. 161-180.
- CUSTÓDIO M.R. (1999). Mecanismos de interação celular em Porifera. *Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da UFRJ para obtenção do grau de Doutor em Ciências.*
- CHEHADE C.C., DIAS R.L.A., BERLINCK R.G.S., FERREIRA A.G., COSTA L.V., RANGEL M., MALPEZZI E.L.A., FREITAS J.C. & HAJDU E. (1997). 1,3-Dimethylisoguanine, a new purine from the marine sponge *Amphimedon viridis*. *J. Nat. Prod.*, **60**: 729-731.
- COLEMAN A.W. & MAI, J.C. (1987). Ribosomal DNA ITS-1 and ITS-2 sequence comparison as a tool for predicting genetic relatedness. *J mol Evol* **45**:168-177.
- DALOZE D. & BRAECKMAN J.C. (1994). In: R. W. M. van Soest, Th. M. G. van Kempen & J. G. Braeckman (eds.), *Sponges in Time and Space. Balkema, Rotterdam*, pp. 441-452.

- DEPRÉS L., KRUGER F.J., IMBERT E.B., ADAMSON, M.L. (1995) ITS-2 ribosomal RNA indicates *Schistosoma hippopotami* is a distinct species. *Int.J. Parasitol.* **25**: 1509-1514.
- DESSAUER H.C., COLE C.J. & HAFNER M.S. (1996). Collection and storage of tissues, pp. 29-47. In: Hillis, D.M., C. Moritz & B. K. Mable (1996, eds.). *Molecular Systematics*, 2nd. edition. *Sinauer Associates, Sunderland, Mass., USA*.
- DESQUEYROUX-FÁUNDEZ, R. & VALENTINE, C. (2002). Family Niphatidae Van Soest, 1980. In: HOOPER, J. N. A. & VAN SOEST, R. W. M. (2002, eds). *Systema Porifera: A guide to the classification of sponges*. *Kluwer Academic, Plenum Publishers, New York, USA*.
- DE VOS L., RÜTZLER K., BOURY-ESNAULT N., DONADEY C. & VACELET J. (1990). Atlas of Sponge Morphology. *Smithsonian Institution Press, Washington D.C.*
- DILLON N., AUSTIN A.D. & BARTOWSKY E. (1996). Comparison of preservation techniques for DNA extraction from hymenopterous insects. *Insect Molecular Biology*. **5** (1): 21-24.

DUCHASSAING DE FROMBESSIN,P.& MICHELOTTI G. (1864). Spongiaires de la Mer Caraïbe. *Natuurkundige Verhandelingen van de Hollandsche Maatschappij der Wetenschappen te Haarlem* (2) **21**(3): 1-124.

DUMDEI E.J., BLUNT J.W., MUNRO M.H.G., BATTERSHILL C.N. & PAGE M.J. (1996). The Whys and whats of sponge chemistry: why chemists extract sponges and what problems does this cause?, pp. 353-364. *In: Sponge Sciences. Multidisciplinary perspectives*, WATANABE, Y. & FUSETANI, N. (eds.). Springer, Tokyo.

EL TAI N.O., OSMAN O.F., EL FARI M., PRESBER W. & SCHÖNIAN G. (2000). Genetic heterogeneity of ribosomal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **94**: 575-579.

ENGEL S. & PAWLIK J.R. (2000). Allelopathic activities of sponge extracts. *Marine Ecology Progress Series MEPS* 207:273-281.

ERPENBERCK D., BREEUWER J.A.J., van der VELDE H.C. & VAN SOEST R.W.M. (2002). Unravelling host and symbiont phylogenies of halicondrid sponges (Desmospongiae, Porifera) using a mitochondrial marker. *In: Marine Biology* 141:377-386.

FAULKNER D.J. (1999). Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, **16**: 155-198. *Review*.

FAULKNER D.J. (1978) Antibiotics from marine organisms. In: *Topics in Antibiotic Chemistry, Vol. 2*, SAMMES, P. G. (ed.), pp. 9–58. *Ellis Horwood Ltd., Chichester*.

GARSON M. G. (1994). The biosynthesis of sponge secondary metabolites: Why it is important?, pp. 427-440. In: *Sponges in time and space. Proceedings of the 4th International Conference on the Biology of Sponges*. VAN SOEST, R. W. M.; VAN KEMPEN, T. M. G. & BRAECKMAN, J. C. (eds.), *Rotterdam: Balkema*.

GUIMARÃES A.C.R. (2002). Estudo da variação genética de cinco populações de *Hymeniacidon* aff. *heliophila* Parker, 1910 (Demospongiae, Halichondrida, Halichondriidae) por técnicas de biologia molecular. *Monografia de conclusão do Curso de Ciências Biológicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro*, xviii, 70p, il.

HAJDU E., MURICY G., BERLINCK R.G.S. & FREITAS J.C. (1996). Marine porifera diversity in Brasil: through knowledge to management. In: Bicudo, C.E.M. & N.A. Menezes (eds.), *Biodiversity in Brazil, a First Approach*. CNPq, São Paulo, pp. 157-171.

HAJDU, E., BERLINK, R. G. S. & FREITAS, J. C. (1997). Porífera, capítulo 4, pp. 20-30. In: *Biodiversidade do Estado de São Paulo - Síntese do conhecimento ao final do século XX*. (3): *Invertebrados marinhos*. MIGOTTO, A. E. & TLAGO, C. G. (eds.). FAPESP, São Paulo.

HAJDU, E., R. G. S. BERLINCK & J. C. FREITAS (1999). Porífera. In: Migotto, A. E. & C. G. Tiago (eds.), *Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX*, (3): *Invertebrados marinhos*. FAPESP, São Paulo, pp. 19-30.

HAMMOND, J.B.W., SPANSWICK, G. & MAWN, J.A. (1996). Extraction of DNA from preserved animal specimens for use in Randomly Amplified Polymorphic DNA analysis. *Analytical Biochemistry*. **240**: 300-302.

HARPER, J.L. & D.L. HAWKSWORTH (1995). Preface. In: *Hawksworth, D.L. (ed.), Biodiversity Measurement and Estimation*. Chapman & Hall, Londres, pp. 5-12.

HARTMAN, W. D. DE (1955). A collection of sponges from the West Coast of the Yucatan Peninsula with the descriptions, of two new species. *Bull. mar. Sci. Gulf Caribbean* 5, p. 161-189, 10 figs.

- HECHTEL, GJ (1976): Zoogeography of brazilian marine Demospongiae, 237-259. In: Harrison FW & Cowden, RR (ed.) *Aspects of Sponge Biology*. New York: Academic Press.
- HILLIS, D. M. & DAVIS, S.K. (1988). Ribosomal DNA: Intraspecific polymorphism, concerted evolution and phylogeny reconstruction. *Syst. Zool.* **32**:63-66.
- HILLIS, D. M. & DIXON, M. T. (1991). Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *Q. Rev. Biol.* **66** (4): 411-453.
- HILLIS, D. M., MORITZ, C. & MABLE, B. K. (1996, eds.). *Molecular Systematics*, 2nd. edition. *Sinauer Associates, Sunderland, Mass.*
- HOOPER, J N.A. & LÉVI, C (1994). Biogeography of Indo-west Pacific sponges: Microcionidae, Raspailiidae, Axinellidae. In: Soest, R.W.M. van, Kempen, Th.M.G. van & Braekman, J.C. (eds.), *Sponges in Time and Space*. Balkema, Rotterdam, Holanda, p. 191-212.
- HOOPER, J. N. A. (2000). *Spongguide: guide to sponge collection and identification*. <http://www.qmuseum.qld.gov.au/naturewelcome> ["sponges", "download sponge classification"].

HOOPER, J. N. A. & VAN SOEST, R. W. M. (2002, eds). *Systema Porifera: A guide to the classification of sponges*. Kluwer Academic, Plenum Publishers, New York, USA.

KELLY-BORGES, Michelle; VALENTINE, Clare (1995). The sponges of the tropical island region of Oceania: a taxonomic status review. In: Maragos, J.E., Peterson, M.N.A., Eldredge, L.G., Bardach, J.E. & Takeuchi, H.F. (eds.), *Marine and Coastal Biodiversity in the tropical Island Pacific region. Species Systematics and Information Management Priorities*. East-West Centre, Honolulu, v. 1, p. 83-120.

KELLY-BORGES, M. (1995). Sponges out of their depth. *Nature*, 373: 284.

KELMAN, D., KASHMAN, Y., ROSENBERG, E., ILAN, M., IFRACH, I. & LOYA, Y. (2001). Antimicrobial activity of the reef sponge *Amphimedon viridis* from the Red Sea: evidence for selective toxicity. *Aquatic Microbial Ecology* 24:9-16.

KLEPPE, K., OHTSUKA, E., KLEPPE, R. AND KHORANA, H.G. (1971) Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replication of short synthetic DNA's as catalysed by DNA polymerases. *J. Mol. Biol.* 56,341-346.

KNOWLTON, N. (1993). Sibling species in the sea. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 24: 189-216.

- KORNBERG, A. (1980). DNA Replication. Freeman, San Francisco. *In: Molecular Systematics, 2nd. edition.* HILLIS, D.M., MORITZ, C. & MABLE, B. K. (1996, eds.). Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- KOULMAN A, PROKSCH P, EBEL R, BEEKMAN AC, VAN UDEN W, KONINGS AW, PEDERSEN JA, PRAS N & WOERDENBAG HJ, (1996). Cytotoxicity and mode of action of aeroplysinin-1 and a related dienone from the sponge *Aplysina aerophoba*. *J Nat Prod Jun*; **59**(6):591-4.
- LAMARÃO, F. R. M. (2002). Distinção de espécies de *Aplysina* Nardo, 1834 (*Aplysinidae*, *Verongida*, *Demospongiae*) da costa brasileira por métodos moleculares. *Monografia de conclusão do Curso de Ciências Biológicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro*, xiv, 52 p., il.
- LANA, P. C., M. G. CAMARGO, R. A. BROGIM & V. J. ISAAC (1996). O bentos da costa brasileira. Avaliação crítica e levantamento bibliográfico (1858-1996). *Rio de Janeiro: FEMAR*, pp 432.
- LAUBENFELS, M.W. de (1936a). A discussion of the sponge fauna of the Dry Tortugas in particular, and the West Indies in general, with material for a revision of the families and orders of the Porifera. *Papers Tortugas Lab.* 30, p. i-iii 1-225, 22pls.

LAUBENFELS, M.W. de (1949). Sponges of the Western Bahamas. *Amer. Mus. Novitates* 1431, p. 1-25.

LAUBENFELS, M.W. de (1954). The sponges of the West Central Pacific. *Oregon State Monogr. Zool.* 7, p. i-x 1-306, 12 pls., 20 figs

LEHNERT, H. (1993). Die Schwämme von Cozumel (Mexiko). Bertandsaufnahme, kritischer vergleich taxonomischer Merkmale und Beschreibung einer neuen Art. *Acta Biol Benrodis.* 5:35-127

LEIPE, DD (1996). Biodiversity, genomes, and DNA sequence databases. *Curr. Opin. Gen. Dev.*, 6: 686-691.

LITTLE, F.J. (1963). The sponge fauna of the St. George's Sound, Apalachee Bay, and Panama City regions of the Florida Gulf Coast. *Tutelane Stud. Zool.* 11:31-71.

LÔBO-HAJDU, G., J. J. MANSURE, A. SALGADO, E. HAJDU, G. MURICY & R. M. ALBANO (1999). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis can reveal intraspecific evolutionary patterns in Porifera. *Memoirs of the Queensland Museum*, 44: 317-328.

LÔBO-HAJDU, G.; A. SALGADO; A. C. R. GUIMARÃES; F. R. M. LAMARÃO; R. M. ALBANO; C. M. M. SILVA; E. HAJDU & G. MURICY (2001). Use of PCR-linked single strand conformation polymorphism of rDNA ITS sequences to distinguish species of Porifera. In: *Resúmenes del IX COLACMAR, Noveno Congreso Latinoamericano sobre Ciencias del Mar, San Andrés isla, Colombia*, p. 158, resumo expandido em CD.

LÔBO-HAJDU G, GUIMARÃES ACR, SALGADO A, LAMARÃO FRM, VIEIRALVES T, MANSURE JJ, ALBANO RM. ITS sequence variation in Porifera revealed by PCR-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). *Aceito no Boll. Mus. Inst. Biol. Univ. Genova*.

MAY RM (1992). How many species inhabit the earth? *Sci. Am.* **267**: 42-48.

MAYER, A. M. S. & GUSTAFSON, K.R. (2003). Marine pharmacology in 2000: antitumor and cytotoxic compounds. *Int. J. Cancer*: **105**: 291-299.

MCCONNELL, O.J., LONGLEY, R.E. & KOEHN, F.E. (1994). The discovery of marine natural products with therapeutic potential. In: *Gullo, V.P. (ed.), The Discovery of Natural Products with Therapeutic Potential. Butterworth-Heinemann, Boston, E.U.A.*, p. 109-130.

MCPHERSON, M.J. & MOLLER, S.G (2000). PCR. The Basics: from background to bench. *Springer-Verlag, New York Inc., New York, USA*. Pp. 276.

MERCEREAU-PUIJALON O., FANDEUR T., BONNEFOY S., JACQUEMOT C. & SARTHOU J.L. (1991), A study of the genomic diversity of *Plasmodium falciparum* in Senegal. 2. Typing by the use of the polymerase chain reaction. *Acta Trop*, **49**(4):293-297.

MIGOTTO, A. E. & TIAGO, C. G. (1997). XXX, capítulo 3, pp. XX-XX. In: *Biodiversidade do Estado de São Paulo - Síntese do conhecimento ao final do século XX. (3): Invertebrados marinhos*. MIGOTTO, A. E. & TIAGO, C. G. (eds.). *FAPESP*, São Paulo.

MORAES, F.C. de (2000).Taxonomia e Repartição de Porífera na Reserva Biológica de Atol das Rocas (RN). *Monografia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, publicada (em parte)*, 56.p, 28 figs, 4 pranchas.

MORAES, F.C. de, VILANOVA, E.P., MURICY, G. (2003). Distribuição das esponjas (Porifera) na reserva biológica do Atol das Rocas, Nordeste do Brasil. *Arquivos do Museu Nacional, Rio de Janeiro*, v.61, n.1, p. 13-22, 2 figs.

- MORITZ, C. & HILLIS, D.M. (1996). Molecular Systematics: context and controversies, pp. 1-13. In: Hillis, D.M., C. Moritz & B. K. Mable (1996, eds.). *Molecular Systematics*, 2nd. edition. Sinauer Associates, Sunderland, Mass., USA.
- MUNRO M. H. G., BLUNT J. W., LAKE R. J., LITAUDON M. (1994). From seabed to sickbed: What are the prospects? In: R. W. M. van Soest, Th. M. G. van Kempen e J. G. Braeckman (eds.), *Sponges in Time and Space*. Balkema, Rotterdam, pp. 473-484.
- MURICY, G. (1989). Sponges as Pollution-monitors at Arraial do Cabo, Southeastern Brazil. *Rev. Brasil. Biol.*, **49**(2): 347-354.
- MURICY, G., HAJDU, E., CUSTODIO, M.; KLAUTAU, M.; RUSSO, C. & PEIXINHO, S. (1991). Sponge distribution at Arraial do Cabo, S.E. Brazil, pp. 1183-1196. In: *Coastal Zone '91, Proc. VII Symposium on Coastal and Oceanic Management*, MANGOON, O.T., CONVERSE, H., TIPPIE, V., TOBIN, L. T. & CLARK, D. (eds.). ASCE Publications. Long Beach, USA.
- MURICY, G. (1991). Structure des Peuplements de Spongiaires Autour de L'égout de Cortiou (Marseille, France). *Vie Milieu*, **41**(4): 205-221.

MURICY, G., HAJDU, E., ARAUJO, F. V. & HAGLER, A. N. (1993). Antimicrobial activity of Southwestern Atlantic shallow-water marine sponges (Porifera). *Sci. Mar.* **57** (4): 427-432.

MURICY G & MORAES F (1998): Marine sponges of Pernambuco State, NE Brasil. *Rev. bras. Oceanogr.* **46** (2)213-217.

MURICY, G. & RIBEIRO, S.M. (1999). Shallow-water Haplosclerida (Porifera, Demospongiae) from Rio de Janeiro State, Brazil (southwestern Atlantic). *Beaufortia*, **49**: 83-108.

MURICY, G. & SILVA, O. C. (1999). Esponjas marinhas do Estado do Rio de Janeiro: Um recurso renovável inexplorável, pp155-178. In: *Ecologia dos ambientes costeiros do Estado do Rio de Janeiro. Série Oecologia Brasiliensis*, vol. VII. SILVA, S. H. G. & LAVRADO, H. P. (eds). PPGE-UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.

NORTH & COHEN, 1979. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, **15**: 113-158.
Aranucleosides and aranucleotides in viral chemotherapy. *Pharmacol Ther.* 1979; **4**(1): 81-108. Review.

- ODORICO, D.M. & MILLER, D.J. (1997). Internal and external relationships of the Cnidaria: implications of primary and predicted secondary structure of the 5' - end of the 23S - like rDNA. *Proc R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **264** (1378), 77-82.
- ORITA, M., SUZUKI, Y., SEKIYA, T. & HAYASHI, K. (1989). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, **5**: 874-879.
- PALUMBI, S. (1996). Nucleic Acids II: the polymerase chain reaction. In: Hillis, D.M., C. Moritz & B. K. Mable (1996, eds.). *Molecular Systematics*, 2nd. edition. *Sinauer Associates, Sunderland, Mass.*
- PEREZ, T (2000). Évaluation de la qualité des milieux côtiers par les Spongiaires: état de l'art. *Bull. Soc. Zool. Fr.*, **125**(1):17-25.
- PIMM SL, RUSSEL GJ, GITTLEMAN JL, BROOKS TM (1995). The future of biodiversity. *Science*, **269**: 347-350.
- POMPONI, S. A. (1976). A cytological study of the Haliclonidae and the Callyspongiidae (Porifera, Demospongia, Haplosclerida). In: F. W. Harrison & R. C. Cowden, eds. *Aspects of sponge biology*. *Academic Press*, New York, 354pp.

- POST, R.J., FLOOK, P.K. & MILLEST A.L. (1993). Methods for the preservation of insects for DNA studies. *Biochemical Systematics and Ecology*. **21**(1): 85-92.
- PROKSCH, P., EDRADA, R.A. & EBEL, R. (2002). Drugs from the seas - current status and microbiological implications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**: 125-134.
- RANGEL, M., SANCTIS, B., FREITAS, J.C., POLATTO, J.M., GRANATO, A.C., BERLINCK, R.G.S & HAJDU, E. (2001). Cytotoxic and neurotoxic activities in extracts of marine sponges (Porifera) from southeastern Brazilian coast. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **262**:31-40.
- REISS, R.A., SCHWERT, D.P. & ASHWORTH A.C. (1995). Field preservation of Coleoptera for molecular genetic analyses. *Environmental Entomology*. **24**(3): 716-719.
- RICHELLE-MAURER E., DEGOUDENNE Y., VAN DE VYVER G., DEJONGHE L. (1994). Some aspects of heavy metal tolerance in freshwater sponges. In: *Sponges in Time and Space* pp. 351-354, van Soest RWM, van Kempen ThMG & Brackman JC (eds.). AA Balkema, Rotterdam, The Netherlands.
- RÜTZLER, Klaus (1978). Sponges in coral reefs. In *Coral Reefs: Research Methods. Monographs on Oceanographic Methodology*, v. 5, p. 299-313.

RÜTZLER, K. (1990, ed.). New Perspectives in Sponge Biology. *Smithsonian Institution Press*, Washington D.C.

RUPPERT, E. E & BARNES R. D. (1994, eds). *Invertebrates Zoology*. 6th edition, Saunders College.

SAIKI R. K., SCHARF S., FALOONA F., MULLIS K. B., HORN G. T., ERLICH H. A. & ARNHEIM N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230** (4732): 1350-1354.

SALGADO-MENDES, A. M. (2003). Distinção de espécies do gênero *Mycale* Gray, 1867 (Mycalidae, Poecilosclerida, Demospongiae) por técnicas moleculares. *Monografia de conclusão do Curso de Ciências Biológicas, Universidade do Rio de Janeiro - UNIRIO*, xviii, 63p: il.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

SCHMIDT, O. (1968). Die Spongien der Küste von Algier. Mit Nachträgen zu den Spongien des Adriatischen Meeres (drittes Supplement). Engelmann, Leipzig, iv + 44pp., 5pls.

- SILVA, C. M. M. (2002). Revisão das espécies de *Geodia* Lamarck, 1815 (Porifera, Astrophorida, Geodiidae) do Atlântico Ocidental e Pacífico Oriental. *Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, IBUSP*, 305 p., il.
- SOLÉ-CAVA, A.M. & THORPE, J.P. (1991). High levels of gene variation in marine invertebrates. *Biol. J. Linn. Soc.*, **44**: 65-80.
- SOLÉ-CAVA, A.M. & THORPE, J.P. (1994). Evolutionary genetics of marine sponges. In: R. W. M. van Soest, Th. M. G. van Kempen e J. C. Brackman (eds.), *Sponges in Time and Space*. Balkema, Rotterdam, pp. 55-63.
- SUNNUCKS, P., WILSON, A.C.C., BEHEREGARAY, L.B., ZENGER, K., FRENCH, J. & TAYLOR A C. (2000). SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular Ecology*, **9**:1699-1710.
- TORRES, R. T., R. G. S. BERLINCK, A. MAGALHÃES, A. B. SCHEFER, A. G. FERREIRA, E. HAJDU. & G. MURICY (2000). Arenosclerins A-C and Haliclonacyclamine E, new tetracyclic alkaloids from a Brazilian endemic Haplosclerid sponge *Arenosclera brasiliensis*. *J. Nat. Prod.*, **63**: 1098-1105.

VACELET, J. (1979). La place dès spongiaires dans lês systemes trophiques marins, pp. 259-270. In: *Biologie des spongiaires*, LÉVI, C. & BOURY-ESNAULD, N. (eds.), Paris: Édition du CNRS.

VACELET, J. & BOURY-ESNAULT, N. (1995). Carnivorous sponges. *Nature*, **373**: 333-335.

VACELET, J. (1999a). Outlook to the future of sponges. *Memoirs fo the Queensland Museum* **44**: 27-32.

VAN SOEST, R. W. M. (1980). Marine sponges from Curaçao and other Caribbean localities. *Part II: Haplosclerida. Studies on the fauna Curaçao and other Caribbean Islands*. LXII, 1-173.

VAN SOEST, R. W. M. (1984). Marine sponges from Curaçao and other Caribbean localities. *Part III: Poecilosclerida. Stud. Fauna Curaçao Caribb. Isl.* **66** (192): 1-167.

VAN SOEST, R. M. W. (1994). Demospongie distribution patterns, pp. 213-223. In: *Sponges in time and space*. Proceedings of the 4th International Conference on the Biology of Sponges. VAN SOEST, R. W. M.; VAN KEMPEN, T. M. G. & BRAECKMAN, J. C. (eds.), Rotterdam: Balkerma.

VAN SOEST, R. W. M. & BRAECKMAN, J. G. (1999). Chemosystematics of Porifera: a review. In: Proceedings of the 5th International Sponge Symposium: Origin & Outlook, HOOPER, J. N. A. (ed.). *Memoirs of the Queensland Museum*, 44: 569-589.

VERRIL, A. E. (1907). The Bermuda Islands. Part IV: Geology and paleontology, and Part V: An account of the coral reefs. Trans. *Connecticut Acad. Arts Sci.* 12, p. 45-348, pls. 16-40, 181 figs.

WELLS, H. W. & WELLS, M.J. & GRAY, J.E. (1960). Marine sponges of North Carolina. *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.* 76, p. 200-245, 63 figs.

WIEDENMAYER, F. (1977a.) A monograph of the shallow – water Sponges of the Western Bahamas. Birkhäuser Verlag, Basel Stuttgart, 287 pp., 43 pls. (*Experientia Supplementum* 28).

WILSON, E. O. (1988, ed.). Biodiversity. *National Academic Press*, Washington D.C.

WILSON, H. V. (1902). The sponges collected in Porto Rico in 1889 by the U.S. Fish Commission Steamer “Fish Hawk”. *Bull. U.S. Fish Comm.* 2, p. 375-411, 30 figs.

WINSTON, Judith (1999). Describing Species - Practical Taxonomic Procedure for Biologists. *Columbia University Press*, 512 p.

WÖRHEIDE G (1998) The reef cave dwelling ultraconservative coralline demosponge *Astrosclera willeyana* Lister 1900 from the Indo-Pacific. Micromorphology, ultrastructure, biocalcification, isotope record, taxonomy, biogeography, phylogeny. *Facies* 38, 1-88.

WÖRHEIDE G, DEGNAN BM, HOOPER JNA & Reitner J (2003) Phylogeography and taxonomy of the Indo-Pacific reef cave dwelling coralline demosponge *Astrosclera willeyana* - new data from nuclear internal transcribed spacer sequences. In: Proceedings of the 9th International Coral Reef Symposium (ed. Moosa K), pp. 339-346. *Indonesian Institute of Sciences & State Ministry for Environment, Jakarta*.

WÖRHEIDE G, HOOPER JNA & DEGNAN BM (2002) Phylogeography of western Pacific *Leucetta ôchagosensisô* (Porifera: Calcarea) from ribosomal DNA sequences: implications for population history and conservation of the Great Barrier Reef World Heritage Area (Australia). *Molecular Ecology* 11, 1753-1768.

ZEA, S. (1987). Esponjas del Caribe Colombiano. *Editorial Catalogo Científico*, 286p..

ZHU, X.; D'AMELIO, S.; PAGGI, L.; GASSER, R. B. (2000). Assessing sequence variation in the internal transcribed spacers of ribosomal DNA within and among members of the *Contracaecum osculatum* complex (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae). *Parasitol Res.*, **86**: 677-683.